



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

FLÁVIA MACHULIS MAGALHÃES

**DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE
Klebsiella pneumoniae OBTIDOS EM HOSPITAIS DA REDE PÚBLICA E PRIVADA
DE MACEIÓ – AL**

Recife
2020

FLÁVIA MACHULIS MAGALHÃES

**DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE
Klebsiella pneumoniae OBTIDOS EM HOSPITAIS DA REDE PÚBLICA E PRIVADA
DE MACEIÓ – AL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Áreas de concentração: Microbiologia e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Alves

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Sampaio Feitosa

Recife
2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Magalhães, Flávia Machulis

Detecção de genes de resistência e virulência em isolados de *Klebsiella pneumoniae* obtidos em hospitais da rede pública e privada de Maceió – AL / Flávia Machulis Magalhães- 2020.

74 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Luiz Carlos Alves

Coorientadora: Ana Paula Sampaio Feitosa

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2020.

Inclui referências.

1. *Klebsiella pneumoniae* 2. Antimicrobianos 3. Virulência

I. Alves, Luiz Carlos (Orientador) II. Feitosa, Ana Paula Sampaio (Coorientadora) III. Título

579.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-074

FLÁVIA MACHULIS MAGALHÃES

**DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE
Klebsiella pneumoniae OBTIDOS EM HOSPITAIS DA REDE PÚBLICA E PRIVADA
DE MACEIÓ – AL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

APROVADA: 19/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves (Orientador)

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti (Examinador Interno)

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes (Examinador Externo)

Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco

Recife
2020

Dedico esse trabalho à minha família, meu alicerce.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo a minha **família** por acreditar no meu potencial mais do que eu mesma. Por me apoiar e sacrificar tanto para que eu pudesse me estabelecer em Recife. Por ter a certeza de que, mesmo diante de tantas adversidades, eu alcançaria meu objetivo. Por eles terem compreendido os momentos de dificuldades, estresses e minhas ausências. Por compreenderem um natal separados. Por darem todo o amor que precisei para ser forte.

Obrigada aos meus professores, **Luiz Carlos Alves**, **Fábio Brayner** e **Ana Paula Sampaio**, por me darem luz quando me faltou, por me orientarem na vida acadêmica e pessoal. Por confiarem no meu trabalho e me ensinarem com tanta paciência e sabedoria. Por serem amigos e professores. Por me acolherem e permitirem essa vitória na minha vida. Obrigada à **Dyana Veras**, por ter me dado a oportunidade de conhecer toda a equipe que do LBCM, por sua mente brilhante e orientações nos momentos que precisei. Sei que forças maiores não permitiram que sua coorientação continuasse, mas sua amizade e ensinamentos me foram essenciais para a realização desse trabalho.

Obrigada aos meus companheiros de moradia, **Mariana**, **Aline** e **Thiago**, os quais me salvaram tantas vezes que perdi as contas. Que me cuidaram, enxugaram minhas lágrimas, aguentaram meus estresses e frustrações, me ouviram nos desabafos e que até me alimentaram. Vocês foram peças-chaves nessa jornada, minha gratidão a vocês é eterna.

A **Aloísio**, pelo apoio incondicional, estímulo e norteamto. Por ter sido um dos alicerces na história que me trouxe a essa jornada e por me ajudar a não desistir.

A **Catarina Freitas**, por compartilhar seu aprendizado na vida acadêmica. Por ajudar nos trabalhos e experimentos. Por ser amiga, no âmbito pessoal e do trabalho. Pelo voto de confiança. Por me enxergar quando quase ninguém o fez. Obrigada a **Janderson** e **Daivyane**, pelos abraços, conselhos e energia que me salvaram em diversos momentos. Obrigada a meus amigos do **LBCM** pelos auxílios nos experimentos, ensinamentos e momentos de descontração. Obrigada a **Jesus** e **Geone** pela parceria e esforço diante das dificuldades da realização deste trabalho.

Obrigada a **André**, por me trazer o sorriso. Pelo companheirismo e compreensão. Pelos momentos coloridos meios a tantos de degradês de cinza. Pelo carinho e ternura que me permitiram retomar o fôlego na reta final dessa batalha. E aos meus amigos de longa data, **Alisson**, **Denise** e **Juliana** que mesmo longe, foram presentes. Pelo amor, carinho e apoio emocional durante essa jornada.

RESUMO

Klebsiella pneumoniae está entre as espécies bacterianas mais isoladas de amostras clínicas no mundo e no Brasil. Seus fatores de virulência associados a mecanismos de resistência a antimicrobianos ocasionam dificuldades de tratamento das infecções e um aumento nas taxas de mortalidade. Assim, este estudo propôs investigar a ocorrência de genes de resistência e virulência em isolados de *K. pneumoniae* obtidos em hospitais das redes pública e privada de Maceió – AL, durante julho a dezembro/2018. A confirmação da espécie foi obtida por MALDI-TOF e o DNA extraído por método formol-clorofórmio. O perfil de resistência foi obtido por disco difusão e/ou por microdiluição em caldo. A presença dos genes de resistência a antimicrobianos e virulência foi verificada por PCR seguida de sequenciamento dos amplicons. Para detecção do fenótipo e hipermucoviscosidade, foi empregado o teste do fio mucoviscoso. Foram obtidos 40 isolados, dentre os quais a taxa de resistência a carbapenêmicos, aminoglicosídeos e polimixinas foi de 37,5%, 62,5% e 17,5%, respectivamente. A prevalência do gene *bla*_{KPC} foi alta (97,6%) e foram encontrados os genes *bla*_{NDM} em 63,4% e o *bla*_{IMP-1} em 9,8% dos isolados. Os genes *rmtD* e *mcr-1* foram detectados em 67,5% e em 32,5% dos isolados, respectivamente. Foram avaliadas duas mutações no gene *pmrB*, as quais não demonstraram influência sobre a resistência a polimixina, enquanto duas mutações no gene *mrgB* potencialmente ocasionaram a desativação do gene e, consequentemente, diminuição da suscetibilidade à polimixina. Todos isolados apresentaram os genes *cpsP* e *mrkA*, em contrapartida, os genes *mrkD*, *ecpA*, *iutA* e *ybtS* foram encontrados em 51,2%, 53,7%, 85,4% e 41,5%, respectivamente. Foram identificados dois isolados apresentando o fenótipo de hipermucoviscosidade, ao qual não foi associado o perfil e hipervirulência. O presente estudo abrange a epidemiologia molecular em isolados MDR de *K. pneumoniae* de Alagoas, sendo pioneiro na região. Foi encontrada uma alta coexistência entre os genes de resistência. Os dados fornecidos geram subsídios teóricos para o estabelecimento de medidas de controle adequadas a dispersão e disseminação de genes de resistência.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*. Multidroga-resistência. *mcr-1*. Hipermucoviscosidade.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is among the most isolated bacterial species from clinical samples in the world and in Brazil. Its virulence factors associated with mechanisms of resistance to antimicrobials cause difficulties in treating infections and an increase in mortality rates. Thus, this study proposed to investigate the occurrence of resistance and virulence genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained in public and private hospitals in Maceió - AL, during July to December, 2018. Confirmation of the species was obtained by MALDI-TOF and the DNA extracted by the formaldehyde – chloroform method. The profile of resistance to antimicrobials was obtained by diffusion disc and/or microdilution in broth. The presence of the resistance and virulence genes was verified by PCR followed by sequencing of the amplicons. To detect the hypermucoviscosity phenotype, the string test was performed. Forty isolates were obtained, which the resistance rate to carbapenems, aminoglycosides and polymyxins was 37.5%, 62.5% and 17.5%, respectively. The prevalence of the *bla*_{KPC} gene was worrying (97.6%), whilst the *bla*_{NDM} gene were found in 63.4% and *bla*_{IMP} in 9.8% of the isolates. The *rmtD* and *mcr-1* genes were detected in 67.5% and 32.5% of the isolates, respectively. Two mutations in the *pmrB* gene were evaluated, which showed no influence on polymyxin resistance, while two mutations in the *mrgB* gene probably caused the deactivation of the gene and, consequently, decreased isolate's susceptibility to polymyxin. All isolates presented *cpsP* and *mrkA* genes, and the *mrkD*, *ecpA*, *iutA* and *ybtS* genes were found in 51.2%, 53.7%, 85.4% and 41.5% of the isolates, respectively. Two isolates were identified presenting the hypermucoviscosity phenotype, to which the hypervirulence profile were not associated. The present study covers molecular epidemiology in MDR isolates from *K. pneumoniae* from Alagoas, being a pioneer in the region. A high coexistence between resistance genes has been found. The data provided generate theoretical support for the establishment of adequate control measures for the dispersion and dissemination of resistance genes.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*. Multidrug-resistance. *mcr-1*. Hypermucoviscosity.

LISTA DE FIGURAS

Referencial Teórico

FIGURA 1 -	Estrutura das fímbrias do tipo 3 e suas funções.....	23
FIGURA 2 -	Funções da cápsula (CPS) em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	24
FIGURA 3 -	Ilustração dos três fatores de virulência (Sideróforos, Cápsula e Fímbrias) nas cepas clássicas e hipervirulentas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28

Resultados

FIGURA 4 -	Fenótipo hipermucoviscoso caracterizado pela presença de um fio mucoviscoso igual ou maior que 5 mm. (A) isolado AR19; (B) isolado AR82.....	59
------------	--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Resultados

GRÁFICO 1 -	Sítios de coleta das quais as cepas de <i>K. pneumoniae</i> foram isoladas.....	43
GRÁFICO 2 -	Porcentagem de resistência encontradas nos isolados de <i>K. pneumoniae</i> obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL, frente aos antimicrobianos de acordo com as classes.....	47
GRÁFICO 3 -	Ocorrência dos genes de resistência nos isolados de <i>K. pneumoniae</i> obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL.....	48
GRÁFICO 4 -	Gráfico de dispersão, no qual os pontos representam o diâmetro dos halos observados no teste de disco difusão frente ao meropenem, imipenem e ertapenem, dos isolados contendo o <i>bla_{KPC}</i> como único codificador de carbapenemase encontrado. A média e o desvio padrão estão representados na forma de barra e linha. Quanto maior o diâmetro do halo, maior a suscetibilidade do isolado ao antimicrobiano.....	49
GRÁFICO 5 -	Gráfico de dispersão, no qual os pontos representam o diâmetro dos halos observados no teste de disco difusão frente a meropenem (A), imipenem (B) e ertapenem (C), de acordo com a quantidade de genes de carbapenemases detectados nos isolados (0-1, isolados com até um gene e 2-3, isolados com dois ou três genes). A média e o desvio padrão estão representados na forma de barra e linha. Quanto maior o diâmetro do halo, maior a suscetibilidade do isolado ao antimicrobiano.....	50
GRÁFICO 6 -	Número de isolados de <i>K. pneumoniae</i> , obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL, resistentes aos carbapenêmicos de acordo com a presença do gene <i>bla_{NDM}</i>	50
GRÁFICO 7 -	Número de isolados de <i>K. pneumoniae</i> , obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL, resistentes aos aminoglicosídeos de acordo com a presença do gene <i>rmtD</i>	51
GRÁFICO 8 -	Gráfico de dispersão, no qual os pontos representam o diâmetro dos halos observados no teste de disco difusão frente a amicacina (A) e a gentamicina (B), de acordo com a presença o gene <i>rmtD</i> detectado nos isolados (<i>rmtD</i> ⁻ , isolados que não possuem o gene; <i>rmtD</i> ⁺ , isolados portadores do gene). A média e o desvio padrão estão representados na	

	forma de barra e linha. Quanto maior o diâmetro do halo, maior a suscetibilidade do isolado ao antimicrobiano.....	51
GRÁFICO 9 -	Associação entre isolados resistentes a polimixina e a presença do gene <i>mcr-1</i> nos isolados de <i>K. pneumoniae</i> obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL.....	52
GRÁFICO 10 -	Ocorrência dos genes de resistência nos isolados de <i>K. pneumoniae</i> obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL.....	53
GRAFICO 11 -	Associação do sítio de coleta com a presença do gene <i>mrkD</i> nos isolados de <i>K. pneumoniae</i> obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL.....	54
GRAFICO 12 -	Associação do sítio de coleta com a presença do gene <i>ecpA</i> nos isolados de <i>K. pneumoniae</i> obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL.....	54
GRAFICO 13 -	Quantidade de genes de virulência de acordo com a fonte dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL.....	58

LISTA DE TABELAS

Metodologia

TABELA 1 -	Relação dos antimicrobianos utilizados na técnica de disco-difusão e valores de resistência e sensibilidade.....	38
TABELA 2 -	Relação dos antimicrobianos, suas respectivas diluições e valores de resistência e sensibilidade utilizados para obtenção da CIM.....	39
TABELA 3 -	Primers utilizados para detecção dos genes de resistência e virulência analisados nos isolados de <i>K. pneumoniae</i>	41

Resultados

TABELA 4 -	Aspectos epidemiológicos referente à origem dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> provenientes de quatro hospitais de Maceió, AL.....	44
TABELA 5 -	Perfil de resistência dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL e suas respectivas classificações quanto aos antimicrobianos resistentes e espectro de resistência.....	45
TABELA 6 -	Relação das CIMs obtidos frente aos carbapenêmicos, aminoglicosídeos e polimixinas e a presença dos determinantes genéticos de resistência e de virulência dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL.....	55
TABELA 7 -	Dados acerca dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> , obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL, os quais continham cinco genes de virulência.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC	Amoxicilina/ácido clavulânico
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
AMINO	Aminoglicosídeos
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ATM	Aztreonam
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão de cérebro e coração)
BLR	B-lactâmico Resistente
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação Ética
CARBA	Carbapenêmicos
CAZ	Ceftazidima
CEFAL	Cefalosporinas
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CFL	Cefalotina
CFO	Cefoxitina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
COL	Colistina
CR	Carbapenemico-resistente
CPM	Cefepime
CPS	Capsula Polissacarídica
CRO	Ceftriaxona
CRX	Cefuroxima
CTX	Cefotaxima
DI	Dados insuficientes
ERT	Ertapenem
ESBL	β -lactamase de espectro estendido
EUCAST	Comitê Europeu de Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana
GEN	Gentamicina

IAM	Instituto Aggeu Magalhães
INO	Informação não obtida
IPM	Imipenem
LBCM	Laboratório de Biologia Celular e Molecular
LEV	Levofloxacin
LPS	Lipopolissacarídeo
m/ Δ m	Massa pela massa total
MALDI TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
MBL	Metalo-beta-lactamase
MDR	Multidroga-resistente
Mg ²⁺	Íon magnésio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto
MPM	Meropenem
NOR	Norfloxacin
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PB	Polimixina B
PBP	Proteína de ligação a penicilina
PEN + INIB	Penicilina associada a um inibidor de β -lactamase
PEN	Penicilina G
PENCL	Penicilinas
PCR	Reação de Cadeia da Polimerase
POLI	Polimixinas
PPT	Piperacilina/tazobactam
QUINO	Quinolonas
rRNA	RNA ribossomal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIM	Seoul Imipenemase
STE	SDS Tris EDTA
Susc	Susceptibilidade
TBE	Tris ácido Bórico EDTA

TE	Tris ácido etilenodiamino tetra-acético
TET	Tetraciclina
TFA	Ácido trifluoracético
TU	Tjernberg e Ursing
UTI	Unidades de Terapia Intensiva
WT	<i>Wild Type</i> (Forma selvagem)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Objetivos	19
1.1.1	Objetivo Geral	19
1.1.2	Objetivos específicos	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20
2.2	Resistência a antimicrobianos	21
2.3	Virulência	22
2.3.1	Fímbrias	23
2.3.2	Capsula polissacarídica (CPS)	25
2.3.3	Sideróforos	27
2.4	Antibióticos β-lactâmicos	29
2.4.1	Carbapenêmicos	29
2.4.2	Resistência microbiana a B-lactâmicos: B-lactamases	30
2.5	Aminoglicosídeos	31
2.5.1	Resistência a Aminoglicosídeos	32
2.6	Polimixinas	32
2.6.1	Resistência a polimixinas	33
3	METODOLOGIA	35
3.1	Local de estudo	35
3.2	Obtenção dos isolados	35
3.3	Aspectos epidemiológicos	36
3.4	Identificação e confirmação da espécie	36
3.5	Perfil de resistência	36
3.5.1	Suscetibilidade aos carbapenêmicos e aos aminoglicosídeos	37
3.5.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	38
3.6	Extração de DNA	39
3.7	Deteção e sequenciamento dos genes relacionados a resistência antimicrobiana e aos fatores de virulência	40
3.8	Avaliação das mutações nos genes <i>pmrB</i> e <i>mgrB</i>	42

3.9	Análises estatísticas	42
5	RESULTADOS	42
5.1	Isolados e seu perfil de resistência aos antimicrobianos	42
5.2	Presença dos genes de resistência	47
5.3	Análise de mutações dos genes <i>pmrB</i> e <i>mgrB</i>	48
5.4	A presença dos genes e a suscetibilidade dos isolados	48
5.5	Presença dos genes de virulência	53
5.6	Fenótipo de Hiper mucoviscosidade	58
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae está entre as espécies bacterianas mais isoladas no mundo (OMS, 2017), sendo, no Brasil, o agente etiológico mais prevalente em infecções primárias de corrente sanguínea em pacientes adultos das unidades de terapia intensiva (UTI) (BRASIL, 2017). Esse microrganismo é uma bactéria gram-negativa amplamente distribuída na natureza, mas que pode estar presente de forma assintomática no trato intestinal e mais raramente em vias aéreas de pessoas saudáveis (BRISSE et al., 2006). Se tornam patogênicas sobretudo em pacientes hospitalizados, acarretando infecções principalmente nos tratos urinário e respiratório (MARTIN; BACHMAN, 2018). Suas cepas podem se disseminar extensivamente entre os pacientes, ocasionando surtos, especialmente em UTIs neonatais (BRISSE et al., 2006).

A progressão de colonização para doença infecciosa não depende apenas da imunocompetência do hospedeiro, mas também dos genes que as bactérias possuem e/ou adquirem (MARTIN; BACHMAN, 2018), tais como aqueles que ao conferir fatores de virulência ou resistência, permitem que a célula bacteriana mantenha-se aderida e/ou invada o tecido do hospedeiro, resista aos mecanismos de defesa do hospedeiro e/ou sobreviva ao tratamento terapêutico que está sendo utilizado no paciente. Contudo, esse entendimento ainda não está bem elucidado e mais estudos são necessários para compreender como essa progressão ocorre. Variações no genoma podem modular o risco de progressão para a doença (MARTIN; BACHMAN, 2018), tornando-se necessário o rastreamento desses genes em isolados associados a infecções, sobretudo hospitalares.

Quatro componentes de virulência em *Klebsiella* estão envolvidos na sua patogênese: adesinas, polissacarídeos capsulares, lipopolissacarídeos (LPS) e sistemas de captação de ferro (sideróforos) (BRISSE et al., 2006). Geralmente as cepas dependem não só de um, mas de diversos componentes que facilitem a colonização e o crescimento bem-sucedidos em um hospedeiro, esteja esse com o sistema imunológico totalmente funcional ou comprometido (CLEGG; MURPHY, 2016).

Fatores de virulência associados a mecanismos de resistência a antimicrobianos ocasiona dificuldades de tratamento das infecções e, conseqüentemente, um aumento nas taxas de mortalidade e nos custos de tratamento (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). A Organização Mundial de Saúde (OMS) vem advertindo uma era pós-antibiótica iminente, na

qual o uso de antimicrobianos terá eficácia reduzida de forma crítica, devido ao aparecimento de isolados multidroga-resistentes (MDRs) de diferentes espécies bacterianas (OMS, 2015).

A *Klebsiella pneumoniae* é uma das bactérias que apresentaram um aumento significativo na resistência a antibióticos nas últimas décadas, sendo a resistência a β -lactâmicos o que traz maior impacto no tratamento eficaz (MARTIN; BACHMAN, 2018). A resistência aos β -lactâmicos carbapenêmicos em *K. pneumoniae* está associada a um aumento da clínica e da mortalidade, estatisticamente significativa, em pacientes adultos hospitalizados (KOHLE et al., 2017).

Os antibióticos β -lactâmicos são de grande importância clínica devido sua baixa toxicidade e amplo espectro de ação, podendo ser divididos em quatro tipos, sendo os carbapenêmicos os que possuem maior espectro de ação (TORTORA et al., 2016). Contudo, a presença e disseminação de resistência tem comprometido a eficácia destes antimicrobianos para tratamento de infecções por isolados MDRs, condição amplamente relacionada a aquisição de genes para produção de enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico do fármaco (SAMPAIO; GALES, 2016; MARTIN; BACHMAN, 2018). Neste contexto, os aminoglicosídeos vêm se tornando um importante componente na terapia em pacientes infectados por patógenos MDR, como por exemplo CRE (KRAUSE et al., 2016).

As polimixinas mantiveram-se em desuso por um longo período devido à sua alta nefrotoxicidade (KAYE et al., 2016). Entretanto, seu uso foi retomado por ser um dos últimos recursos para tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas MDR (THEURETZBACHER et al., 2015).

Embora a resistência a antimicrobianos seja uma resposta natural dos microrganismos, tal evento é acelerado, dentre outros fatores, pela pressão seletiva relacionada ao uso abusivo e irracional de antimicrobianos (CASTANHEIRA et al., 2019). A era pós-antibiótica pode ser contida através de cuidados e uso apropriados dos antimicrobianos, mas para o entendimento e resposta aos padrões de resistência, ações cruciais devem ser implantadas, tais como investigações dos mecanismos de resistência em diferentes localidades (OMS, 2015).

Em 2011, Maceió-AL apresentou surtos de infecções em pacientes hospitalares causadas por isolados bacterianos MDRs, os quais foram relatados apenas em jornais locais e nacionais. Apenas em 2015, Barros et al. relataram a ocorrência de genes de resistência em isolados de *P. aeruginosa* obtidos em instituições e hospitais de Maceió/AL, não havendo estudos publicados antes ou posteriormente analisando quais os genes mais envolvidos na disseminação de resistência em outras espécies bacterianas, tampouco informações acerca de

sua virulência. A escassez de publicações em Maceió-AL, demonstra a necessidade de uma investigação abrangente, traçando a epidemiologia dos genes de resistência e de virulência relacionados a isolados bacterianos causadores de infecções em hospitais da cidade.

Devido à grande disseminação de genes de virulência e resistência aos principais antimicrobianos utilizados para tratamento de infecções bacterianas no Brasil e da escassez de publicações referente ao tema em Maceió-AL, o atual projeto propõe investigar a ocorrência de genes de resistência em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* obtidos em hospitais da rede pública e privada de Maceió – AL.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar genes de resistência e de virulência em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* obtidos como multidroga-resistentes em hospitais da rede pública e privada de Maceió – AL

1.1.2 Objetivos específicos

- Relacionar os aspectos epidemiológicos referente à origem dos isolados;
- Analisar o perfil de resistência aos carbapenêmicos e aos aminoglicosídeos nos isolados obtidos;
- Confirmar a resistência dos isolados frente ao meropenem e a amicacina, verificando a concentração inibitória mínima;
- Determinar a concentração mínima inibitória dos isolados obtidos frente a colistina e a polimixina B;
- Investigar a presença dos genes de resistência, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{GES}, *rmtD* e *mcr-1* nos isolados obtidos;
- Avaliar a ocorrência de mutações nos genes *pmrB* e *mgrB* nos isolados resistentes às polimixinas;
- Avaliar os determinantes genéticos de resistência frente ao perfil de suscetibilidade dos isolados obtidos;
- Analisar a ocorrência dos genes codificadores de fatores de virulência, *mrkA*, *mrkD*, *ybtS*, *cpsP*, *iutA*, *ecpA*, *rpmA* e *magA* nos isolados obtidos;
- Avaliar os genes de virulência frente ao perfil de hiper mucoviscosidade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria gram-negativa pertencente à ordem *Enterobacteriales*, a qual inclui outros patógenos conhecidos, tais como *Escherichia coli*, *Yersinia* spp., *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. (MORALES-LÓPEZ et al., 2019). Nos meios de ágar, possui uma colônia grande, geralmente com consistência mucoide, a qual é conferida pela cápsula de polissacarídeo ligada à parte externa da membrana bacteriana, e fermenta lactose (MARTIN; BACHMAN, 2018). Suas cepas são imóveis, ornitina-negativas e indol-negativas, característica geralmente utilizada para diferenciá-las de *Klebsiella oxytoca* (KONEMAN et al., 2018).

As espécies de *Klebsiella* estão comumente presentes em uma variedade de fontes ambientais, como solo, vegetação e água, contribuindo para processos bioquímicos e geoquímicos (BRISSE et al., 2006). Dentre as espécies pertencentes ao gênero, a *K. pneumoniae* é a mais frequentemente isolada de materiais biológicos humanos. Sendo detectada nas fezes de 30% dos indivíduos saudáveis, com essa frequência aumentada em crianças ou após uso de antibióticos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Essa bactéria também pode ser encontrada de 1 a 6% na orofaringe de pessoas saudáveis, aumentando para até 20% em pacientes hospitalizados (KONEMAN, 2018), 35% em etilistas e 36% em diabéticos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Conhecida como patógeno oportunista, *K. pneumoniae* causa infecções principalmente em recém-nascidos, pacientes cirúrgicos, etilistas e portadores de neoplasias e diabetes (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Dentre as infecções causadas por *K. pneumoniae* em pacientes neonatos, idosos e imunocomprometidos, a infecção urinária é a mais comum e frequentemente está associada a pacientes portadores de diabetes *mellitus* e/ou à presença de cateteres (MARTIN; BACHMAN, 2018), podendo evoluir para uma bacteremia grave, com altas taxas de morbidade e mortalidade (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A presença de cateter representa um ótimo nicho para desenvolvimento de biofilme bacteriano, contribuindo para que as células do microrganismo criem um ambiente no qual elas possam se proteger do sistema imunológico do hospedeiro (CLEGG; MURPHY, 2016).

Klebsiella pneumoniae também causa um número significativo de infecções sérias adquiridas na comunidade, incluindo abscesso hepático piogênico, pneumonia e meningite (HOLT et al., 2015). A pneumonia por *K. pneumoniae*, geralmente adquirida por indivíduos etilistas crônicos e/ou com comprometimento da função pulmonar (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008), pode causar necrose extensa, hemorragia com produção de escarro avermelhado e, em casos mais graves, abscessos pulmonares, doença cavitária crônica, hemorragia interna e hemoptise (KONEMAN et al., 2018).

2.2 Resistência a antimicrobianos

A epidemiologia das infecções causadas por *K. pneumoniae* evoluiu ao longo das últimas décadas. Na era pré-antibiótica, suas infecções eram mais associadas a pneumonia em etilistas e pacientes diabéticos, mas recentemente, infecções relacionadas ao trato urinário, aos pulmões, à cavidade abdominal, a dispositivos intravasculares, locais cirúrgicos, tecidos moles e bacteremia subsequente foram as síndromes clínicas mais comuns (SHON et al., 2013).

Klebsiella pneumoniae tem recebido maior notoriedade devido à sua propensão a adquirir determinantes de resistência antimicrobiana e consequente desafio no tratamento (SHON et al., 2013). Na última década, as cepas produtoras de carbapenemases têm se espalhado rapidamente pelos hospitais no mundo, sendo resistentes aos carbapenêmicos, tipicamente a penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (KONEMAN et al., 2018). No Brasil, 43,3% dos isolados de *K. pneumoniae* provenientes de UTI são resistentes a carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro, a maior taxa entre as espécies de *Enterobacteriales* (BRASIL, 2018).

O aumento de isolados de *K. pneumoniae* multidroga-resistentes (MDRs) tem sido identificado como uma ameaça de alto risco para a saúde humana (HOLT, 2015). Kohler e colaboradores (2017) observaram, com base em uma meta-análise, uma taxa média de casos fatais em infecções causadas por *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos (*carbapenem-resistant K. pneumoniae* – CRKP) de 46%, sendo esse número bastante consistente entre os estudos analisados. É provável que o aumento da mortalidade, nesses casos, ocorra pelos seguintes motivos (KOHLE et al., 2017): as comorbidades em pacientes com infecções ocasionadas por Enterobacteriaceae resistente a carbapenêmicos (*Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae* - CRE) são mais severas; aumento da virulência nas cepas produtoras de carbapenemases; menor efetividade no tratamento e maior toxicidade nos antimicrobianos

utilizados nesses tipos de infecção, e pacientes com infecções causadas por CRE possuem menor probabilidade de receber tratamento inicial adequado.

2.3 Virulência

Para crescer, se estabelecer e se proteger da resposta imune de seu hospedeiro, *Klebsiella pneumoniae*, assim como outras espécies bacterianas, precisam desenvolver diferentes estratégias (HOLT et al., 1999; PACZOSA; MECSAS, 2016). Tais estratégias, constituem os fatores de virulência e são responsáveis pela capacidade bacteriana de produzir toxinas, resistir às defesas imunológicas do hospedeiro e alvejar e colonizar uma superfície apropriada do tecido por adesão específica (KLEMM; SCHEMBRI, 2000). Assim, os fatores de virulência implicam na patogenicidade bacteriana (BRISSE et al., 2006) e geralmente é necessário que a cepa tenha uma variedade de fatores para obter sucesso em sua colonização e crescimento no corpo do hospedeiro (HOLT et al., 1999).

Dentre os principais e mais conhecidos fatores de virulência produzidos por *K. pneumoniae* podemos citar as fímbrias, as cápsulas e os sideróforos (PACZOSA; MECSAS, 2016). Cada um desenvolve um papel diferente nos variados tipos de infecções causadas por *K. pneumoniae*, bem como nas diferentes estirpes (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Em países ocidentais, comumente as infecções são causadas por cepas de *K. pneumoniae* conhecidas como “clássicas” (cKP), responsáveis, principalmente, por infecções urinárias, abdominais, associadas à dispositivos médicos, em sítio cirúrgico, em tecidos moles, bacteremia subsequente e pneumonia em pacientes imunocomprometidos (POMAKOVA et al., 2012). Mas nas últimas décadas, uma variante hipervirulenta (hvKP) vem causando graves quadros clínicos de infecções, adquiridas na comunidade, com abscessos piogênicos e alto potencial (11-80%) de infecções metastáticas em pacientes imunocomprometidos ou não (LIU et al., 1986; POMAKOVA et al., 2012; CATALÁN-NÁJERA et al., 2017).

Nesse contexto, hipervirulência em *K. pneumoniae* poderia ser definido como a capacidade a bactéria em produzir infecções invasivas (disseminação metastáticas) após o primeiro foco de infecção em adultos saudáveis (CATALÁN-NÁJERA et al., 2017).

Cepas hvKP possuem maior nível de virulência quando comparadas às cKP, pois: (1) apresentam maior resistência aos efeitos bactericidas do soro e atividades bactericidas mediadas por neutrófilos devido a superprodução de exopolissacarídeos capsulares; (2) possuem habilidade de produzir infecções invasivas com capacidade de disseminação

metastásica em pacientes saudáveis; (3) possuem maior eficiência na captação de ferro (POMAKOVA et al., 2012; CATALÁN-NÁJERA et al., 2017; LOPEZ et al., 2019).

Cepas hipervirulentas são comumente associadas a um perfil de hipermucoviscosidade (HMV), o qual se caracteriza pela formação de um filamento viscoso maior que 5 mm após tocar uma colônia com a alça bacteriana e afastá-la (HAGIYA et al., 2014). Entretanto, autores sugerem que a hipermucoviscosidade e a hipervirulência são dois fenótipos distintos, pois ao mesmo tempo que variantes hvKP ocorrem sem o fenótipo HMV, isolados caracterizados como HMV podem apresentar-se como cepas cKP (RUSSO et al., 2015; CATALÁN-NÁJERA et al., 2017). Portanto, ainda há poucos dados na literatura que consigam esclarecer esse ponto e mais estudos nesse sentido são necessários.

As variantes hvKP/HMV costumam ser sensíveis a diversas classes de antimicrobianos, o que evita um desenvolvimento de suas infecções, acarretando uma baixa taxa de mortalidade (NAMIKAWA et al., 2016). Ainda assim, tais infecções podem trazer consequências incapacitantes devido às metástases, principalmente para o sistema nervoso central e para os olhos (POMAKOVA et al., 2012).

Nesse sentido, cepas hvKP resistentes a carbapenêmicos têm se tornado uma preocupação mundial, uma vez que podem aumentar o dilema terapêutico, prolongando o quadro infeccioso e aumentando a possibilidade de metástases e das taxas de mortalidade, não só em pacientes imunocomprometidos, mas também em pacientes saudáveis (YAO et al., 2015; HOLT et al., 2015).

2.3.1 Fímbrias

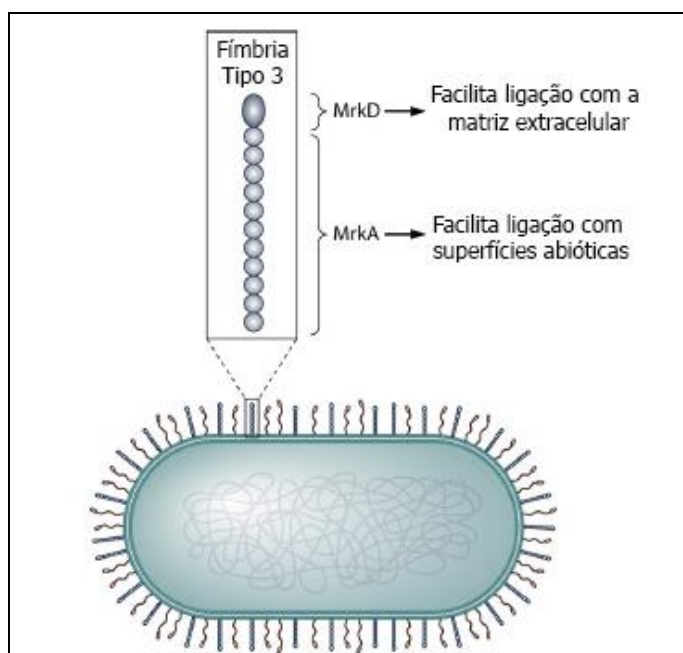
A adesão da célula bacteriana às superfícies do tecido do hospedeiro é geralmente um passo crucial na colonização e no desenvolvimento da infecção (HOLT et al., 1999). Em *K. pneumoniae* as fímbrias são importantes mediadores dessa função (PACZOSA; MECSAS, 2016). Fímbrias, também denominadas de pili, são estruturas que constituem filamentos poliméricos com comprimentos de até 1µm e diâmetros de 2 nm, que se estendem a partir da superfície da célula bacteriana (KLEMM; SCHEMBRI, 2000). Em *K. pneumoniae*, as mais estudadas incluem as fímbrias dos tipos 1 (manose-sensível) e 3 (manose-resistente), sendo a última, importante na produção de biofilme, pois promove o contato das células com a superfície e entre si (JAGNOW; CLEGG, 2003; SCHROLL et al., 2010).

Fímbrias do tipo 3 medeiam a aderência das células bacterianas a raízes de plantas, células endoteliais humanas, epiteliais do trato respiratório, células uroepiteliais e colágeno, além de superfícies abióticas como cateteres (JAGNOW; CLEGG, 2003; BRISSE et al.,

2006). São filamentos em hélice (PACZOSA; MECSAS, 2016), cujo eixo é composto predominantemente pela subunidade principal MrkA e pela adesina fimbrial MrkD, localizada no topo da organela (Figura 1) (BRISSE et al., 2006).

MrkA facilita a adesão e formação do biofilme em superfícies plásticas, independentemente da adesina MrkD (LANGSTRAAT et al., 2001; JAGNOW; CLEGG, 2003). Enquanto o MrkD facilita a ligação das células bacterianas a proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, como o colágeno, e a células derivadas do trato urinário (LANGSTRAAT et al., 2001; JAGNOW; CLEGG, 2003; CLEGG; MURPHY, 2016).

Figura 1 – Estrutura da fímbria do tipo 3 e suas funções.



FONTE: adaptado de PACZOSA; MECSAS, 2016.

Fímbrias do tipo 3 são codificadas pelo *cluster* dos genes contíguos *mrk*, os quais, em *K. pneumoniae*, podem estar presentes em plasmídeo e/ou em cromossomo (GERLACH et al., 1989; SEBGHATI et al., 1998). Esse *cluster* inclui os genes *mrkA* e *mrkD*, que codificam a subunidade principal fimbrial MrkA e a adesina fimbrial mrkD, respectivamente (ALLEN et al., 1991).

Uma fímbria que comumente ocorre em *Escherichia coli* denominada ECP (do inglês *E. coli common pilus*) codificado pelo operon cromossômico *ecpRABCDE*, foi documentada pela primeira vez em associação com cepas de *E. coli* que causam meningite e septicemia em recém-nascido (GARNETT et al., 2012). No entanto, um operon homólogo foi encontrado em

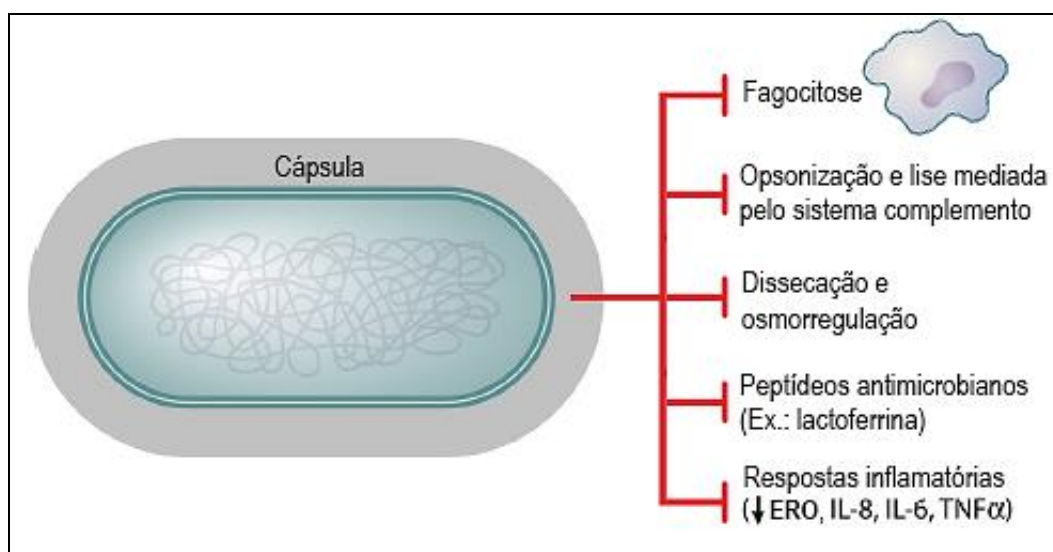
muitas outras enterobactérias patogênicas importantes dos tratos gastrointestinal e urinário, incluindo *K. pneumoniae* (GARNETT et al., 2012; ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013).

Alcántar-Curiel e colaboradores (2013) observaram, em seus ensaios *in vitro* com *K. pneumoniae*, que a ECP teve função em agregar as células bacterianas, levando à formação de microcolônias em células epiteliais cultivadas e à progressão de biofilmes estáveis em superfícies inertes.

2.3.2 Capsula polissacarídica (CPS)

A superfície de uma bactéria é a primeira linha de defesa da célula frente às adversidades do ambiente (WANG et al., 2013). Nesse contexto, geralmente cepas de *K. pneumoniae* são envolvidas por uma capsula polissacarídica (CPS) hidrofílica (Figura 2), responsável pelo brilho e aspecto mucoide das colônias em meio ágar (BRISSE et al., 2006).

Figura 2 – Funções da cápsula (CPS) em *Klebsiella pneumoniae*.



A CPS: (a) protege a célula da fagocitose e da opsonofagocitose da bactéria pelas células do sistema imunológico; (b) bloqueia componentes do sistema complemento, prevenindo lise e opsonização; (c) evita a dissecação e auxilia na regulação da pressão osmótica intracelular; (d) evita a ativação fulminante de respostas inflamatórias, medida pela diminuição das espécies reativas de oxigênio (ERO), IL-8, IL-6, e produção de $\text{TNF}\alpha$.

FONTE: adaptado de PACZOSA; MECSAS, 2016

A CPS evita a dissecação da célula bacteriana em condições adversas, bloqueia infecções de bacteriófagos, promove resistência à fagocitose, auxilia na regulação da pressão

osmótica intracelular e neutraliza a atividade bactericida do sistema imune do hospedeiro (WANG et al., 2013; CRESS et al., 2014; CLEGG; MURPHY, 2016).

A CPS é um dos fatores de virulência mais importantes em *K. pneumoniae*. Quando acapsulada, a cepa demonstra virulência notavelmente menor, enquanto cepas hvKP produzem uma hipercápsula (Figura 3) (KAUFFMANN, 1994; (PACZOSA; MECSAS, 2016).

A complexidade bioquímica dessas cápsulas confere produção de tipos antigênicos cepa-específicos e atualmente, são conhecidos 78 tipos, os quais são utilizados para discriminar os diferentes sorotipos de *K. pneumoniae* durante as infecções (CLEGG; MURPHY, 2016). Eles são denominados antígenos K e seus tipos estão relacionados à gravidade da infecção, especialmente aquelas adquiridas na comunidade (PACZOSA; MECSAS, 2016). Os tipos K1, K2, K5, K20, K54 e K57 são os sorotipos mais patogênicos e prevalentes (CATALÁN-NÁJERA et al., 2017), e os K1 e K2 estão comumente associados a cepas hvKP (MIZUTA et al. 1983; PACZOSA; MECSAS, 2016).

Os genes necessários para a produção de cápsula, tanto em cKP quanto em hvKP estão localizados no operon cromossomal *cps* (PACZOSA; MECSAS, 2016). Dentre os genes desse *cluster*, o sequenciamento do *locus* gênico *wzi* pode ser empregado na tipagem dos antígenos K, contudo, para a identificação dos sorotipos K1 e K1, o rastreamento dos genes *rmpA* e *magA* podem ser utilizados, uma vez que esses super regulam o *locus cps* a nível transcripcional, resultando na síntese da hipercápsula (PACZOSA; MECSAS, 2016). Em cepas K1, além de estar associado a presença de uma hipercápsula (PACZOSA; MECSAS, 2016), o gene *magA* codifica uma enzima polimerase de polissacarídeo responsável pela formação característica da estrutura capsular (FANG et al., 2010).

Nesse sentido, a hipercápsula ocorre em decorrência de uma alta produção de exopolissacarídeos, o que durante muito tempo acreditou-se contribuir para o fenótipo HMV. De fato, a cápsula polissacarídica é responsável pelo aspecto mucoso da colônia, mas não necessariamente pelo fenótipo HMV (CATALÁN-NÁJERA et al., 2017).

Talvez o aspecto HMV dessas cepas ocorra devido à composição da cápsula e não devido à superprodução de polissacarídeos. Lee e colaboradores (2014) observaram maiores concentrações de ácido siálico nas capsulas de hvKP/HMV quando comparadas a cepas que não apresentavam o fenótipo HMV e que ao reduzir o ácido siálico, a hipermucoviscosidade poderia ser perdida.

A região *cps* possui 29 kb e compreende 19 ORFs (do inglês, *open reading frame*), dos quais algumas partes são altamente conservadoras entre os sorotipos capsulares e podem

ser usadas como controle para detecção da presença capsular (HENNEQUIN; FORESTIER, 2007).

2.3.3 Sideróforos

Assim como a maioria dos organismos vivos, em função do seu metabolismo, *Klebsiella pneumoniae* precisa de ferro para sobreviver no ambiente (CLEGG; MURPHY, 2016). Contudo, apesar da abundância de ferro no planeta e a pequena quantidade necessária para o seu crescimento celular, esse metal está indisponível na maioria dos ambientes (WANDERSMAN; DELEPELAIRE, 2004).

No plasma sanguíneo de mamíferos, normalmente o ferro está ligado a moléculas transportadoras como a transferrina, o que torna necessário que patógenos, como *K. pneumoniae*, desenvolvam táticas para competir com seu hospedeiro e adquirir esse ferro (PACZOSA; MECSAS, 2016). Nesse sentido, diversas bactérias sintetizam sideróforos, moléculas de baixo peso molecular e altíssima afinidade com ferro que são secretadas como agentes quelantes, solubilizando e extraíndo ferro da maioria dos minerais ou complexos orgânicos, e que depois retornam para a célula através de receptores específicos na superfície (WANDERSMAN; DELEPELAIRE, 2004; MIETHKE; MARAHIEL, 2007).

Em ambientes pobres em ferro, as variantes hvKP podem elevar sua produção de sideróforos, quando comparadas a cKP (RUSSO et al., 2015; LOPEZ et al., 2019). Aparentemente, quanto mais invasiva a cepa de *K. pneumoniae* for, maior a necessidade de competir eficientemente com o hospedeiro por ferro (CLEGG e MURPHY, 2016).

O sistema sideróforo da Enterobactina obtém predominantemente ferro ligados à transferrina (BROCK et al., 1991) e é regulado por genes cromossomais e sua expressão está ativa em praticamente todas as cepas de *K. pneumoniae*, incluindo as clássicas e as hipervirulentas (PACZOSA; MECSAS, 2016). Entretanto, esse sistema é sequestrado pela lipocalina 2 (Lcn2), uma proteína produzida pelo sistema imune inato dos mamíferos e que se liga aos sideróforos da enterobactina para limitar a aquisição de ferro pela bactéria (SMITH, 2007) e, conseqüentemente, inibir a replicação bacteriana *in vitro* (FLO et al., 2004).

Nesse contexto, a produção de mais um sideróforo pode significar uma colonização bem-sucedida (PACZOSA; MECSAS, 2016). Aparentemente, quanto mais invasiva a cepa de *K. pneumoniae* for, maior a necessidade de competir eficientemente com o hospedeiro por ferro (CLEGG; MURPHY, 2016). Portanto, diversos sideróforos foram desenvolvidos, cuja variação estrutural levam a diferenças na afinidade do ferro, pH ótimo, particionamento da membrana e capacidade de evitar a Lcn2 do hospedeiro (HOLDEN; BACHMAN, 2015).

Cepas de *K. pneumoniae* codificam diversos sideróforos, cuja expressão e a contribuição para a virulência variam (PACZOSA; MECSAS, 2016).

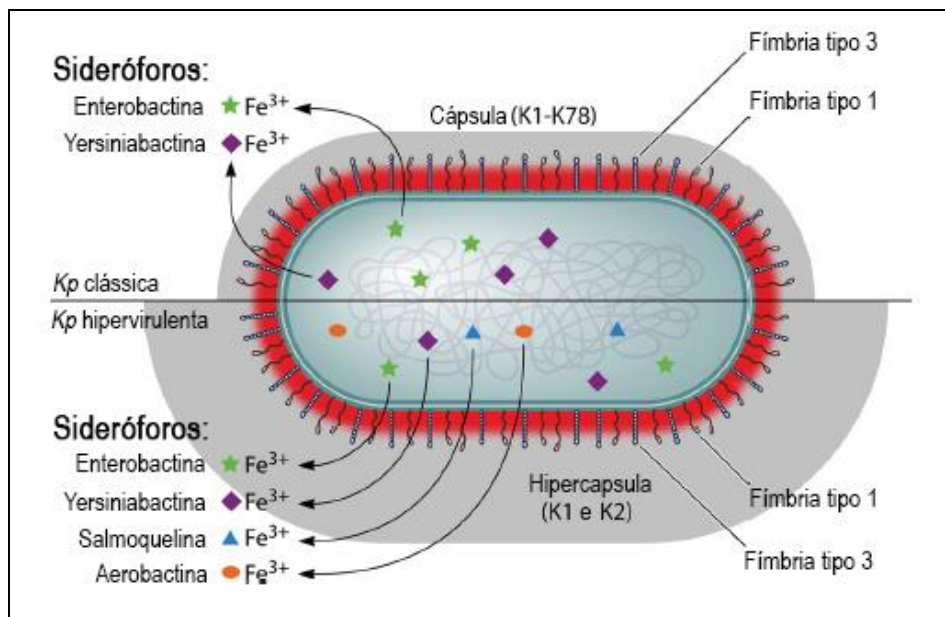
Em Enterobacteriaceae, juntamente com a enterobactina, dois sistemas de sideróforos são mais prevalentes: a aerobactina e a yersiniabactina (LAWLOR et al., 2007), sendo a aerobactina dominante entre cepas hvKP (RUSSO et al., 2015), mas raro entre variantes cKP (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Aerobactina é um sideróforo do tipo hidroxamato-citrato e é produzido por uma menor fração de enterobacteriaceas (LAWLOR et al., 2007). Esse sistema obtém ferro preferencialmente de células e tecidos e, em *Escherichia coli*, está associada a cepas mais invasivas, provavelmente porque, como células produtoras de infecções sistêmicas, estão localizadas em tecidos, com o qual mantém contato direto, tornando-se uma potencial fonte de ferro (BROCK et al., 1991). Em *K. pneumoniae*, dados sugerem que aerobactina desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do fenótipo de hipervirulência (CATALÁN-NÁJERA et al., 2017), possivelmente pelo mesmo motivo. As proteínas da aerobactina são codificadas pelo *cluster* gênico *iucABCD*, o qual está implicado na epidemiologia molecular do perfil hvKP (RUSSO e MARR, 2019), e seu transportador pelo gene *iutA* (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Yersiniabactina é um sistema encontrado em menor fração em enterobacteriaceas que a aerobactina e que foi primeiramente encontrado em espécies do gênero *Yersinia* spp., nas quais está associado a alta patogenicidade (BROCK et al., 1991; PACZOSA; MECSAS, 2016). Em *K. pneumoniae*, esse sistema já foi mais frequente observado em isolados do trato respiratório e em cepas produtoras de β -lactamases, estando sua produção associada ao aumento do risco de infecção respiratória (BACHMAN et al., 2011). Hold e colaboradores (2015) observaram uma alta prevalência de yersiniabactina entre cepas hvKP/HMV.

As proteínas envolvidas na síntese do sistema da yersiniabactina são codificados pelos genes *irp*, enquanto as transportadoras necessárias para a sua secreção são codificadas pelos genes *ybt* e *fyu* e seu receptor pelo gene *ybtQ* (LAWLOR et al., 2007).

Figura 3 – Ilustração dos três fatores de virulência, Sideróforos, Cápsula e Fímbrias, nas cepas clássicas e hipervirulentas de *Klebsiella pneumoniae*.



FONTE: adaptado de PACZOSA; MECSAS, 2016

2.4 Antibióticos β -lactâmicos

Um dos principais grupos de antibióticos, tanto do ponto de vista histórico quanto médico, corresponde ao grupo dos β -lactâmicos que incluem os monobactâmicos, penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas e carbapenêmicos. Todos os antibióticos β -lactâmicos possuem em comum o anel β -lactâmico em sua estrutura, também chamado de núcleo, e o mecanismo de ação, consiste no impedimento da ligação cruzada entre peptideoglicanos, interferindo na construção da parede celular da bactéria, enfraquecendo-a e causando lise celular (TORTORA et al., 2016).

2.4.1 Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos são uma classe antibióticos β -lactâmicos, sendo os mais eficazes contra bactérias gram-negativas devido ao seu espectro de ação extremamente amplo (TORTORA et al., 2016; MELETIS, 2016).

Comparados a uma penicilina, os carbapenêmicos possuem um átomo de enxofre no lugar de um de carbono e uma ligação dupla adicionada ao núcleo (TORTORA et al., 2016). Essa combinação estrutural confere uma estabilidade contra a maioria das β -lactamases (enzimas que inativam β -lactâmicos), incluindo ampicilina e carbenicilina (AmpC) e β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) (MELETIS, 2016).

Dentre os três carbapenêmicos comumente utilizados na clínica brasileira, (4) o meropenem possui uma excelente ação antimicrobiana contra um amplo espectro de bactérias gram-positivas, anaeróbicas e gram-negativas, incluindo *K. pneumoniae*, o imipenem foi o primeiro carbapenêmico disponível, com atividade semelhante ao meropenem, sendo comumente utilizado em infecções mistas e empiricamente no início de infecções (RODLOFF, 2006) e o ertapenem possui espectro semelhante a meropenem e imipenem contra Enterobacteriaceae, gram-positivas e anaeróbicas, entretanto possui menor atividade contra não-fermentadoras (LIVERMORE et al., 2003).

Sendo assim, os antibióticos carbapenêmicos são usados em tratamentos de infecções graves causadas por isolados bacterianos MDRs de espécies gram-negativas, sendo considerados o recurso mais confiável para esse tipo de infecção (MELETIS, 2016). Entretanto, o aparecimento de resistência está cada vez mais comum, inclusive no Brasil (SILVA et al., 2015).

2.4.2 Resistência microbiana a B-lactâmicos: B-lactamases

O principal mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias gram-negativas é a produção de β -lactamases, enzimas versáteis as quais possuem a habilidade de hidrolisar o anel β -lactâmico (TORTORA et al., 2016; BUSH, 2018). Quando essas enzimas apresentam um amplo espectro, conferindo a habilidade de diminuir a suscetibilidade das bactérias a todas as classes de β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, são denominadas carbapenemases (BUSH; FISHER, 2011).

Desde sua primeira descrição, essas enzimas se tornaram bastante diversificadas quanto ao padrão de hidrólise e ao espectro de atividade tornando a sua nomenclatura um desafio. Assim, sua classificação está em constante atualização e adaptação (BUSH, 2018). Elas podem ser divididas em quatro classes moleculares (A, B, C e D) baseadas na sua sequência de aminoácidos (AMBLER, 1980; JURIN; GRUNDSTROM, 1981; HUOVINEN et al., 1988), em três grupos conforme suas características funcionais (BUSH; JACOBY, 2010) ou, ainda, devido aos seus mecanismos catalíticos, aquelas incluídas nas classes A, C e D são conhecidas como serina- β -lactamases e as incluídas na Classe B como metalo- β -lactamases (MBL) (AMBLER, 1980; JURIN; GRUNDSTROM, 1981; HUOVINEN et al., 1988, BUSH; JACOBY, 2010).

Com novas informações acerca dos inibidores das enzimas, a mais recente classificação, de Bush e Jacoby (2010), foi expandida para quatro grupos funcionais (1, 2, 2d e 3) e esquematizada de acordo com o mecanismo de hidrólise das enzimas, bem como sua

classe molecular (BUSH, 2018). Segundo essa classificação, as carbapenemases estão incluídas nos grupos 2, 2d e 3, mais especificamente nos subgrupos:

- Subgrupo 2f (Classe A, Grupo 2, Serina- β -lactamases): carbapenêmicos são substratos distintos para essa família de enzimas, que são pobremente inibidas por ácido clavulânico, mas podem ser inibidas por avibactam. Hidrolisam também as cefalosporinas de amplo espectro, como a ceftazidima, monobactam e penicilina; representado pelas enzimas KPC e SME; as cefalosporinas de amplo espectro não são bem hidrolisadas pelas enzimas SME e IMI, mas o aztreonam pode ser degradado pela maioria delas, exceto pelo GES-3 e pelo GES-4. A família SME, assim como as β -lactamases IMI-1 e NMC-1, são representantes das enzimas por genes cromossômicos. Mais preocupantes, no entanto, são as β -lactamases codificadas por plasmídeo, que incluem a KPC e algumas GES. As carbapenemases KPC, em particular, foram associadas a grandes surtos de infecções por espécies Gram-negativas multirresistentes em hospitais no mundo inteiro.
- Subgrupo 2df (Classe D, Grupo 2d, Serina- β -lactamases): são enzimas OXA com atividades de hidrólise de carbapenêmicos e penicilinas (cloxacilina ou oxacilina); incluem as enzimas OXA-23 e OXA-48, codificadas por genes cromossomais em *Acinetobacter baumannii* e plasmidial em *Enterobacteriaceae*; não são inibidas por ácido clavulânico, mas podem ser inibidas por avibactam.
- Subgrupo 3a (Classe B, Grupo 3, MBL): inclui as principais famílias MBLs codificadas por plasmídeos; hidrolisam todos os β -lactâmicos, exceto monobactâmicos; representado pelas enzimas IMP, VIM e NDM; não podem ser por ácido clavulânico, nem avibactam.
- Subgrupo 3b (Classe B, Grupo 3, MBL): grupo menor de MBLs que preferencialmente hidrolisam carbapenêmicos em contraste com penicilinas e cefalosporinas; representado pela enzima CphA; não podem ser inibidas pelo ácido clavulânico, nem por avibactam.

2.5 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos formam um grupo de antibióticos em que os aminoaçúcares se encontram ligados por ligações glicosídicas e interferem nas etapas iniciais da síntese proteica pela alteração conformacional da porção 30S do ribossomo procariótico (TORTORA et al., 2016). Estão agrupados em 4,6-dissubstituído 2-desoxistreptamina (DOS), 4,5- dissubstituído DOS e 4-monosubstituído DOS, baseado em sua estrutura química (DOI et al., 2016).

Aminoglicosídeos 4,6-dissubstituídos DOS, representados pela gentamicina, tobramicina e ampicacina, são largamente utilizados em tratamentos de infecções causadas por

bactérias gram-negativas, enquanto 4,5-dissubstituído DOS é limitado por sua toxicidade e monosubstituídos DOS, são utilizados na medicina veterinária (DOI et al., 2016).

Os aminoglicosídeos têm sido considerados uma alternativa para o tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas MDR resistentes a carbapenêmicos (KRAUSE et al., 2016). Na América do Sul, a amicacina é especialmente importante devido a um maior índice de resistência à gentamicina encontrado dentre as Enterobacteriaceae (BONELLI et al., 2014).

2.5.1 Resistência a Aminoglicosídeos

Diferentes mecanismos estão envolvidos na resistência a aminoglicosídeos por parte das bactérias, incluindo modificação do fármaco por enzimas, alteração no sítio alvo através de enzimas ou mutação cromossomal (KRAUSE et al., 2016).

Modificação do fármaco por enzima: as enzimas que possuem a capacidade de modificar e, conseqüentemente, inativar os aminoglicosídeos (*Aminoglycoside Modification Enzymes* - AMEs) geralmente são codificadas por genes encontrados em plasmídios com múltiplos elementos de resistência, incluindo betalactamases; categorizadas em três grupos de acordo com sua habilidade de acetilar, fosforilar ou adenilar; as famílias das enzimas são denominadas de *N*-acetiltransferases (AACs), *O*-nucleotidyltransferases (ANTs) e *O*-fosfotransferases (APHs). As enzimas comumente associadas à resistência à amicacina em espécies gram-negativas pertencem às subfamílias AAC(6'), APH(3'), ANT(2'') e ANT(4');

Metilação do rRNA 16S: algumas enzimas (*16S rRNA methyltransferases* - RMTs) possuem a capacidade de modificar um nucleotídeo residual do rRNA 16S específico, de maneira que bloqueia a eficiência do aminoglicosídeo em anelar ao seu sítio alvo; são divididas em duas grandes classes de acordo com o nucleotídeo modificado; as enzimas mais largamente distribuídas dentre espécies bacterianas gram-negativas e associadas à multirresistência são codificadas pelos genes *Arma* e *RmtB*, e o gene *RmtD* que possui particularidade por ser apenas encontrado na América do Sul. O gene *RmtD* foi primeiramente identificado em *Pseudomonas aeruginosa* produtora de SPM-1 (metallo- β -lactamase original de São Paulo, Brasil).

2.6 Polimixinas

As polimixinas são antibióticos cujo mecanismo de ação depende de interações eletrostática e hidrofóbica com a camada de lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa de bactérias gram-negativas (KAYE et al., 2016).

Originalmente introduzidas na década de 1950 para tratamento de infecções ocasionadas por bactérias gram-negativas, seu uso foi descontinuado devido ao alto grau de nefrotoxicidade (KAYE et al., 2016). Entretanto, o aumento de infecções severas causadas por bactérias MDR, especialmente às resistentes a carbapenêmicos, e a falta de opções terapêuticas levou à reconsideração do uso desses fármacos (BARON et al., 2016).

As polimixinas, colistina (também conhecida como polimixina E) e a polimixina B possuem uma estrutura química similar e, geralmente, apresentam uma resistência cruzada (KAYE et al., 2016), ou seja, os mecanismos que conferem resistência a uma polimixina, potencialmente confere resistência à outra. Embora as polimixinas retenham atividade *in vitro* significativa contra a maioria dos organismos gram-negativos, a resistência a esses antibióticos está sendo cada vez mais relatada entre os isolados clínicos (POIREL et al., 2017), principalmente entre os isolados resistentes a carbapenêmicos (JEANNOT et al., 2017).

2.6.1 Resistência a polimixinas

A maioria dos mecanismos que conferem resistência às polimixinas está associada a modificações na camada LPS, o qual é o primeiro alvo dessa classe de antibióticos (OLAITAN et al., 2014). Na maioria das cepas resistentes, substituintes como 4-amino-4-desoxi-l-arabinose (L-Ara4N), fosfoetanolamina (pEtN) ou galactosamina são adicionados enzimaticamente ao lipídio A ou ao núcleo LPS, diminuindo a carga negativa de resíduos de fosfato, o que evita a ligação entre as polimixinas e a superfície celular da bactéria (JEANNOT et al., 2017).

A expressão da maioria dos genes da via de modificação do LPS está sob o controle de vários sistemas de dois componentes (TCSs), como PhoP/PhoQ (PhoPQ) e PmrA/PmrB (PmrAB), cada qual composto por um sensor transmembrana histidina quinase e um regulador de resposta citoplasmática (JEANNOT et al., 2017).

Os eventos genéticos relacionados ao mecanismo de resistência às polimixinas possuem pequenas adaptações entre as famílias, gêneros e até espécies. Os mais conhecidos, entre as gram-negativas que mais acometem as IRAS, são aqueles que ocorrem em *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. São eles:

a) Adição de L-Ara4N

É o mecanismo mais comum de resistência às polimixinas, está presente em *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* e é controlado pelo operon *arnBCADTEF* (também conhecido

por *pmrHFIJKLM*), que por sua vez é regulado pelos sistemas de dois componentes (TCSs) PhoP/PhoQ e PmrA/PmrB (BARON et al., 2016).

Algumas mutações nos genes que codificam estes TCSs, incluindo *phoP*, *phoQ*, *pmrA* e *pmrB* podem levar à superprodução da síntese de L-Ara4N e consequente positividade na carga da membrana da célula bacteriana, prejudicando a capacidade das polimixinas de se ligarem ao seu local de ação (SRINIVAS; RIVARD, 2017).

Ademais, uma pequena proteína transmembrana denominada MgrB, codificada pelo gene *mgrB*, é responsável por um *feedback* negativo no TCS PhoPQ (POIREL et al., 2017). Mutações que interrompem sua leitura, acarretando sua desativação, promovem superexpressão do sistema PhoP/PhoQ, que por sua vez, ativa o operon *arn*, causando modificação na camada LPS associada à resistência a polimixina.

Mutações nos genes *mgrB* parecem ser os mecanismos mais comuns de resistência em *Klebsiella pneumoniae* no Brasil (SAMPAIO e GALES, 2016).

b) Adição de pEtN

A síntese de pEtN também é mediada pelos TCSs PhoP/PhoQ e PmrA/PmrB (SRINIVAS; RIVARD, 2017), mas envolve outros genes codificantes como *eptA* (*pmrC*), *eptB* (*pagC'*) e *eptC* (*cptA*) (BARON et al., 2016).

c) Adição de fosfoetanolamina pelo plasmídio *mcr*

Em 2016, Liu e colaboradores (2016) relataram a descoberta de um plasmídeo contendo um gene codificador de uma pEtN transferase em porcos na China e desde então já foram descritas cinco enzimas distintas codificadas pelos genes plasmidiais *mcr-1*, *-2*, *-3*, *-4*, *-6*, *-7*, que compartilham 81%, 32,5%, 34%, 36,1%, 83% e 35% de identidade na sequência dos aminoácidos com MCR-1, respectivamente (NANG et al., 2019).

No Brasil, o *mcr-1* foi detectado em *K. pneumoniae* em Vitória, ES (AIRES et al., 2017a), em Porto Alegre, SC (DALMOLIN et al., 2018) e em São Paulo, SP (HIGASHINO et al., 2019; NETO et al., 2019). Até a atual data, as outras variações do gene ainda não foram detectadas em *K. pneumoniae* no Brasil.

3 METODOLOGIA

3.1 Local de estudo

A primeira etapa deste projeto foi realizada em quatro hospitais na cidade de Maceió-AL, pelos próprios funcionários e conforme suas rotinas clínicas e laboratoriais, sendo um particular (A) e três públicos (B, C e D).

Para a segunda etapa, os isolados foram encaminhados ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do departamento de parasitologia do Instituto Aggeu Magalhães (LBCM/IAM/FIOCRUZ – PE) em Recife, PE.

3.2 Obtenção dos isolados

Os isolados bacterianos e dados obtidos se deram dentro de aprovação pelo comitê de ética do CCS-UFPE (CAAE-13124919.0.0000.5208).

Foram reservados ao laboratório de pesquisa, isolados bacterianos identificados como espécies gram-negativas e caracterizados como multidroga-resistentes, coletados durante o período de julho a dezembro de 2018 por demanda espontânea dos respectivos hospitais.

A retirada dos isolados nos laboratórios de origem, bem como seu transporte até o LBCM em Recife, PE, onde foram realizadas as análises, foi de responsabilidade dos pesquisadores. Os isolados foram coletados diretamente da placa na qual foi realizada o teste de suscetibilidade a antimicrobianos, com auxílio de swab, e mantidos em meio de transporte stuart (KASVI). Para o transporte, foram acondicionados à temperatura ambiente em embalagem específica do tipo UN 3373, segundo recomendações da ANVISA (BRASIL, 2018), minimizando o risco de contaminação dos pesquisadores envolvidos, de terceiros ou ambiental.

Os isolados bacterianos foram mantidos em estoque congelado a -80°C com glicerol a 20% no departamento de parasitologia do IAM/FIOCRUZ/PE. Para as análises, foram reativados em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI).

3.3 Aspectos epidemiológicos

Os hospitais dispuseram informações acerca dos aspectos epidemiológicos dos isolados, incluindo: a espécie identificada, a data do isolamento, a origem da cultura, o setor de origem, o teste utilizado e o perfil de resistência aos antimicrobianos.

3.4 Identificação e confirmação da espécie

No laboratório de origem, as espécies foram determinadas através de testes bioquímicos e no laboratório de pesquisa, foram confirmadas por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*), através de parceria com o laboratório de Multiusuários de Nanotecnologia no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (LMNANO/CETENE) em Recife, PE.

Para tanto, os isolados bacterianos congelados foram reativados em caldo BHI e encubados de 18 a 24 h em estufa bacteriológica a 37 °C e posteriormente semeados em placas de BHI ágar. Para preparação da placa de leitura do MALDI-TOF-MS as amostras foram inoculadas, em duplicata, com auxílio de ponteiras de 200 µL e adicionados 1 µL de ácido Fórmico 70%, 1 µL de matriz α -cyano-4-hidroxicinâmico em 50% de acetonitrilo e 2,5% de ácido trifluoroscético (TFA).

Para calibração do equipamento, em outro poço foi pipetado 1 µL de matriz α -cyano-4-hidroxicinâmico em 50% de acetonitrilo e 2,5% de TFA juntamente com 1 µL de calibrante para peptídeos de baixo peso molecular (Protein 1 CalibStandard - Bruker Daltonics) contendo seis peptídeos e deixando a placa secar completamente em temperatura ambiente.

A obtenção dos espectros referentes as proteínas ribossomais bacterianas configurou-se utilizando método MBT_FC.par e Geometria MTP 384 ground steel. O aparelho foi considerado calibrado após a identificação de no mínimo quatro dos seis peptídeos do calibrante. Os espectros foram obtidos ao alcançar resolução em massa ($m/\Delta m$) entre 1800 e 2400, utilizando potência do laser em 50 a 60%. A leitura e interpretação dos espectros foi realizada pelo software Bruker Daltonik MALDI Biotyper.

Para este estudo, foram incluídos os isolados identificados como *Klebsiella pneumoniae* através de espectrometria de massa com score maior que 1.999.

3.5 Perfil de resistência

No laboratório de origem, o perfil de resistência dos isolados foi obtido pela técnica de disco-difusão, realizada conforme CLSI (2018). No laboratório de pesquisa, o perfil e

resistência frente aos carbapenêmicos e aminoglicosídeos foram reavaliados por disco-difusão (CLSI, 2018) e o perfil de suscetibilidade frente a meropenem, amicacina, polimixina B e colistina foi analisado através do teste de microdiluição em caldo (CLSI, 2018; EUCAST, 2017).

Para classificação dos isolados de acordo com o perfil, foram considerados: β -lactâmico-resistentes (BLR), os isolados resistentes cefalosporinas de primeira e/ou segunda geração, sendo sensível a cefalosporinas de terceira e/ou quarta geração e a carbapenêmicos ou isolados resistentes a cefalosporina de terceira ou quarta geração, mas sensível a aztreonam e carbapenêmicos; produtores de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), aqueles que apresentaram resistência a pelo menos uma cefalosporina de terceira geração e/ou quarta geração e ao aztreonam, sendo sensível aos carbapenêmicos; carbapenêmico-resistente (CR), aqueles resistentes a pelo menos um carbapenêmicos testado.

Para classificação dos isolados de acordo com a multiroga-resistência, foram considerados multidroga-resistentes (MDR), aqueles isolados resistentes a pelo menos um antimicrobiano de três classes diferentes ou mais.

3.5.1 Suscetibilidade aos carbapenêmicos e aos aminoglicosídeos

Para reavaliação da resistência aos carbapenêmicos e aos aminoglicosídeos dos isolados obtidos, foi utilizada a técnica de disco-difusão com discos de meropenem 10 Mcg, imipenem 10 Mcg, ertapenem 10 Mcg, amicacina 30 Mcg e gentamicina 10 Mcg, (CLSI 2018) (Tabela 1).

Inicialmente, os isolados bacterianos foram reativados em 1 mL de caldo BHI com crescimento de 12-24h em estufa bacteriologia a 37°C. Os isolados foram, então, transferidos para tubo contendo salina estéril (NaCl 0,85%) e ajustados até se obter turvação compatível com a Escala 0,5 de McFarland.

Logo após, foi embebido um swab estéril na suspensão bacteriana, retirado o excesso comprimindo-o na parede do tubo e semeado em cinco direções em placa de petri contendo Mueller-Hinton ágar com espessura 4 mm, abrangendo toda a superfície. Para prosseguir, foram aguardado 10 minutos para a secagem da superfície do ágar. Com o auxílio de pinça flambada, os discos foram dispostos sobre a superfície do meio inoculado e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24 horas.

Para a análise dos resultados, foi utilizada uma régua e a interpretação foi baseada em tabela disposta pelo CLSI (2018).

Para controle de qualidade, foram realizados controles negativos para os meios de cultivo e antimicrobianos, bem como testes com cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabela 1 Relação dos antimicrobianos utilizados na técnica de disco-difusão e valores de resistência e sensibilidade.

Disco utilizado	Diâmetro do halo e interpretação (mm)		
	S	I	R
Meropenem 10 Mcg	≥ 23	20–22	≤ 19
Imipenem 10 Mcg	≥ 23	20–22	≤ 19
Ertapenem 10 Mcg	≥ 22	19–21	≤ 18
Amicacina 30 Mcg	≥ 17	15–16	≤ 14
Gentamicina 10 Mcg	≥ 15	13–14	≤ 12

FONTE: CLSI, 2018; EUCAST, 2019.

S, Sensível; I, Resistência Intermediária; R, Resistente.

3.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação dos CIMs, foi realizada a técnica de Microdiluição em Caldo (CLSI, 2018). O teste foi realizado para avaliar a suscetibilidade dos isolados que apresentaram resistência ou resistência intermediária a meropenem e/ou amicacina, bem como para determinar a suscetibilidade de todos os isolados frente a colistina (polimixina E) e a polimixina B. Para as polimixinas, foram utilizados os critérios de corte do EUCAST (2017) para interpretação dos resultados (Tabela 2).

Para os experimentos, foram utilizadas placas de 96 poços e o caldo Mueller Hinton cátion ajustado, segundo recomendado pela CLSI (2018), utilizando-se os antimicrobianos Meropenem, Amicacina, Polimixina B e Colistina. As concentrações utilizadas foram obtidas por diluição seriada, tendo sido utilizando o padrão de concentrações recomendado para cada antimicrobiano conforme preconizado pela CLSI (2018) e EUCAST (2017) (Tabela 2).

Os isolados bacterianos foram reativados em 1mL de caldo BHI com crescimento de 12-24h em estufa bacteriologia a 37°C. Os isolados foram, então, transferidos para tubo contendo salina estéril (NaCl 0,85%) e ajustados até se obter turbidez compatível com a Escala 0,5 de McFarland. Foi acrescentado 1µL do inóculo em cada poço. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Foram utilizados como controle positivo de crescimento, meio de cultura sem antimicrobiano; controle negativo do meio, um poço contendo apenas o meio utilizado; e controle negativo do antimicrobiano, um poço contendo meio de cultura acrescido do

antimicrobiano testado. Para controle de qualidade, foram realizados testes com cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabela 2 Relação dos antimicrobianos, suas respectivas diluições e valores de resistência e sensibilidade utilizados para obtenção da CIM.

	Variações de concentrações (µg/mL)	S	I	R
Meropenem	1, 2, 4, 8, 16, 32, 128, 256	≤ 1	2	≥ 4
Amicacina	1, 2, 4, 8, 16, 32, 128, 256	≤ 16	32	≥ 64
Colistina	0,5, 1, 2, 4, 8, 16	≤ 2	-	> 2
Polimixina B	0,5, 1, 2, 4, 8, 16	≤ 2	-	> 2

FONTE: CLSI, 2018; EUCAST, 2019.

S, Sensível; I, Resistência Intermediária; R, Resistente.

3.6 Extração de DNA

A extração do DNA total dos isolados bacterianos foi realizada conforme o protocolo de Sambrook e colaboradores (2001). Para a extração dos isolados, os microrganismos foram cultivados em tubos contendo 1mL de meio BHI e incubados em estufa bacteriológica a 37 °C por 18 h. Após o crescimento o conteúdo do tubo foi transferido para microtubos de 1.5 mL e centrifugados durante 5 min a 4.200 g para separar as células bacterianas do meio de cultura. As células foram ressuspensas em 500 µL de TE 10:1 e centrifugadas por 5 min a 1.200 g para remoção do meio de cultura. Removeu-se, então, o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 500 µL de TE 10:1, acrescentou-se 10 µL de Proteinase K a 5 mg/mL e a solução foi colocada em banho-maria a 60 °C por 20 min. Depois, adicionou-se 100 µL de STE (pH 8.0) e tornou-se a incubar a 60 °C por 15 min. Em seguida, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 5 min e posteriormente incubadas no gelo por 5 min. Após o término do tempo, foram acrescentados 130 µL de acetato de amônio (7,5 M) por 15 min. Ao final da incubação, os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 15 min e o sobrenadante (aproximadamente 700 µL) foi transferido para outro microtubo. Adicionou-se o mesmo volume de fenol - clorofórmio - álcool isoamílico e centrifugou-se a 12.000g por 5 min.

A fase aquosa foi transferida para outro tubo e acrescentou-se 420 µL de álcool isopropílico. A solução foi incubada a – 20 °C por 2 h ou – 80 °C por 30 min e depois centrifugada por 10 min a 12.000 g. Retirou-se, então, a fase líquida, preservando-se o *pellet*, o qual foi ressuspensado em 30 µL de água Milli-Q e estocado a – 80 °C.

O DNA obtido foi quantificado em equipamento de espectrofotometria, nanodrop™ 2000/2000C (Thermo Scientific) e observado em gel de agarose a 1% após eletroforese para verificação da integridade.

3.7 Detecção e sequenciamento dos genes relacionados a resistência antimicrobiana e aos fatores de virulência

Para a detecção dos genes de resistência, *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{GES}*, *rmtD* e *mcr-1*, e de virulência, *mrkA*, *mrkD*, *ybtS*, *cpsP*, *iutA*, *ecpA*, *rmpA* e *magA*, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em termociclador (Genepro, Bioer), com os primers determinados na tabela 3.

As reações foram preparadas utilizando a enzima Taq DNA polimerase (Promega). Cada reação continha um volume total de 25 µL por tubo, compreendendo: 20 ng do DNA total, 1U da enzima Taq DNA polimerase (Promega), 200 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (GeHealthcare), 1,5 mM de MgCl₂, 15 pmol de cada primer, 2,5 µL de tampão (10 X) e 15,05 µL de água Milli-Q estéril.

Em geral, foi utilizada a seguinte programação nas reações: 5 min a 96 °C para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos com 1 min a 96 °C para desnaturação, 1 min para anelamento dos iniciadores com a temperatura específica para cada par de primer (tabela 3), seguido de 1 min a 72 °C para extensão. Após os 35 ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 min a 72 °C. Entretanto, para os genes *mcr-1* e *Bla_{NDM}*, foram utilizados 40 ciclos.

Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corados com SYBR Safe (Invitrogen), visualizados e fotografados em transluminador. Como marcador de peso molecular foi utilizado o 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Para a confirmação da identidade dos genes, alguns amplicons foram sequenciados. Para o sequenciamento, os amplicons foram purificados utilizando o kit ExoSAP-IT®, conforme instruções do fabricante, no qual 5 µL do produto da PCR foi misturado a 2 µL da enzima ExoSAP-IT e incubadas em termociclador a 37 °C por 15 min e a 80 °C por mais 15 min. O sequenciamento dos produtos de PCR foi realizado com amostras de DNA fita dupla, através do método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo, pelo método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1992) no Núcleo de Plataformas Tecnológicas 1 (NPT-1) do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE. A análise das sequências de DNA e o alinhamento múltiplo foi realizado utilizando o programa DNAbaser. As sequências

geradas após alinhamento foram analisadas com o auxílio da ferramenta *online* BLAST, do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tabela 3 Primers utilizados para detecção dos genes de resistência e virulência analisados nos isolados de *K. pneumoniae*.

Gene	Nome	Primer (5'-3')	Amplicon (pb)	Referência	T.A. ^a (°C)
<i>bla_{KPC}</i>	KPC1F	GCT ACA CCT AGC TCC ACC TTC	989	MOLAND et al., 2003	66
	KPC1R	ACA GTG GTT GGT AAT CCA TGC			
	KPC-RT1-F	AAT ACA GTG ATA ACG CCG CC	107	Desenhado pela equipe	66
	KPC-RT1-R	GTC CAG ACG GAA CGT GGT AT			
<i>bla_{IMP}</i>	IMP-DIA-F	GGA ATA GAG TGG CTT AAT TCT C	361	MIGLIAVACCA et al., 2002	60
	IMP-DIA-R	GTG ATG CGT CYC CAA YTT CAC T			
<i>bla_{VIM}</i>	VIM-DIA-F	CAG ATT GCC GAT GGT GTT TGG	523	FANG et al., 2008	62
	VIM-DIA-R	AGG TGG GCC ATT CAG CCA GA			
<i>bla_{NDM}</i>	ndm1F	CTG AGC ACC GCA TTA GCC	754	PFEIFER et al., 2011	64
	ndm1R	GGG CCG TAT GAG TGA TTG C			
<i>Bla_{GES}</i>	GES-1A	ATG CGC TTC ATT CAC GCA C	864	POIREL et al., 2000	56
	GES-1B	CTA TTT GTC CGT GCT CAG G			
<i>rmtD</i>	rmtD-P1	ATG AGC GAA CTG AAG GAA AAA CTG C	532	YU et al., 2007	58
	rmtD-P2	GCT CCA AAA GCG GCA GCA CCT TA			
<i>mgrB</i>	mgrB-extF	TTA AGA AGG CCG TGC TAT CC	309	NORDMANN et al., 2016	55
	mgrB-extR	AAG GCG TTC ATT CTA CCA CC			
<i>pmrB</i>	pmrB-ext-F	CCA TGG CTC TGT TTG CAA CTG	1100	NORDMANN et al., 2016	58
	pmrB-ext-R	TCA ATG GGT GCT GAC GTT CTG			
	pmrB-int_F	GCT GAT CCA GCG TCT CGA TC	106	NORDMANN et al., 2016	58
	pmrB-int_R	CAA CAG CAC CTG CTG GTA GC			
<i>mcr-1</i>	CRL-F	CGG TCA GTC CGT TTG TTC	309	LIU et al., 2016	54
	CRL-R	CTT GGT CGG TCT GTA GGG			
<i>mrkA</i>	mrkA F	CCA TGC AGC TGA TAC CAA TG	210	ARES et al., 2016	58
	mrkA R	GCA GCC TGG CAG TTA GAG AC			
<i>mrkD</i>	MrkD 2F	CAC CAA CTA TTC CCT CGA A	226	HENNEQUIN; FORESTIER, 2009	54
	MrkD 2R	ATG GAA CCC ACA TCG ACAT T			
<i>ecpA</i>	CFqecpA	ACC TCG CGT CTT ATC ACC AA	222	ARES et al., 2016	60
	CFqecpA'	CCG CTG ATG ATG GAG AAA G			
<i>iutA</i>	IutA F	CGT CGG GAA CGG GTA GAA TC	302	EL FERTAS-AISSANI et al., 2012	61
	IutA R	GGC TGG ACA TCA TGG GAA CTG G			
<i>ybtS</i>	Yersin F	ATT TAA TGT CGG TTC GCC AG	267	Desenhado pela equipe	61
	Yersin R	GGC TGT CCT GAA ATA CGG AA			
<i>rmpA</i>	rmpa-R	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA	535	EL FERTAS-AISSANI et al., 2012	58
	rmpaR	CTTGCA TGAGCCATCTTTCA			
<i>maga</i>	maga-F	GGTGCTCTTTACATCATTGC	1282	EL FERTAS-AISSANI et al., 2012	58
	maga-R	GCAATGGCCATTGCGTTAG			

^aTemperatura de anelamento.

3.8 Avaliação das mutações nos genes *pmrB* e *mgrB*

Para avaliar a ocorrência de mutações nos genes *pmrB* e *mgrB*, envolvidos com resistência a polimixina, foram selecionados os isolados com CIM > 2 µg/mL frente a Polimixina B e/ou E (colistina), os quais tiveram os genes amplificados através de PCR utilizando primers discriminados na tabela 1 e equipamento e ciclagem descritos no tópico 4.7. Os amplicons obtidos foram sequenciados.

As sequências geradas foram primeiramente analisadas com o auxílio do BLAST (NCBI) para alinhamento e comparação com sequências dispostas no GenBank e a plataforma online PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>) foi utilizada para prever alterações nas funções biológicas das proteínas. Para as análises, a *K. pneumoniae* MGH 78578 (CP000647.1) foi utilizada como sequência de referência.

3.9 Análises estatísticas

Foi utilizado o teste qui-quadrado (teste exato de Fisher) com o intuito de avaliar relação entre: o sítio de coleta e os genes de resistência ou virulência; a presença dos genes de resistência e a resistência bacteriana; a presença de dois genes; e, a presença do gene e a origem do isolado. O teste t não-pareado foi aplicado para analisar se houve relação entre a presença de gene de resistência e a suscetibilidade ao fármaco. Para todas as análises, foi utilizado o software GraphPad Prism 8.0.1.

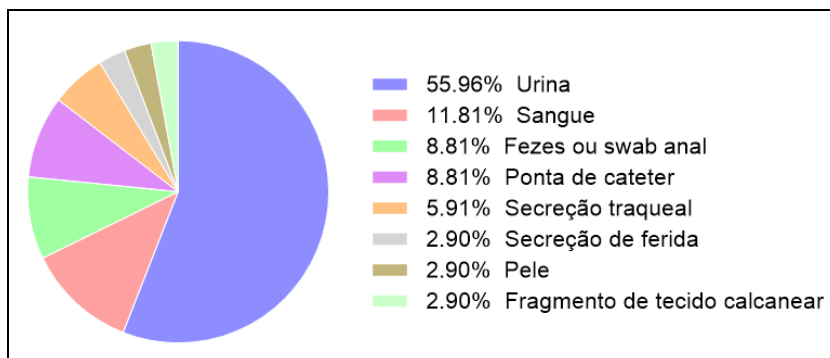
5 RESULTADOS

5.1 Isolados e seu perfil de resistência aos antimicrobianos

Quarenta isolados de *Klebsiella pneumoniae* foram incluídos no estudo, sendo 52,5% (21/40) recebidos pelo hospital A; 32,5% (13/40) pelo hospital B; 7,5% (3/40) pelo hospital C; e, 7,5% (3/40) pelo hospital D. Estas amostras foram isoladas de pacientes em diferentes áreas hospitalares, sendo maioria fora da UTI (54,2%, 13/24) (Tabela 4).

Destes, foram identificados os sítios de coleta de 34 isolados, sendo, 55,9% (19/34) proveniente de urina, 11,8% (4/34) isoladas de sangue, 8,8% (3/34) fezes ou swab retal, 8,8% (3/34) ponta de cateter, 5,9% (2/34) secreção traqueal, 2,9% (1/34) secreção de ferida, 2,9% (1/34) pele e 2,9% (1/34) fragmento de tecido calcâneo (Gráfico 1).

Gráfico 1 Sítios de coleta das quais as cepas de *K. pneumoniae* foram isoladas.



Referente ao perfil de resistência aos antimicrobianos obtido pelos laboratórios de origem, em 35 isolados 100% (35/35) apresentaram resistência a cefalosporina. A Penicilina foi a segunda classe com maior resistência (82,9%, 29/35), seguido por penicilina associada a um inibidor de betalactamase (65,7%; 23/35), aztreonam (62,9%, 22/35), quinolona (54,3%, 19/35) (Tabela 5; Gráfico 2).

Com base no perfil de resistência aos antimicrobianos avaliado no nosso laboratório, 37,5% (15/40) apresentaram resistência a pelo menos um carbapenêmico, 62,5% (25/40) foram resistentes aos aminoglicosídeos, a amicacina e/ou a gentamicina e 17,5% (7/40) foram resistentes a colistina e/ou polimixina B (Tabela 5; Gráfico 2). Ao final, dos 36 perfis que puderam ser avaliados, 32 foram categorizados como MDR.

Ademais, o número de isolados resistentes a aminoglicosídeos entre os 7 isolados polimixina-resistentes foi igual a seis (85,7%), sendo maior para gentamicina (83,3%, 5/7). Adicionalmente, 42,9% (3/7) dos isolados polimixina-resistentes também foram resistentes a carbapenêmicos. Dessa forma, cinco dos sete isolados polimixina-resistentes foram classificados como MDR.

Tabela 4 Aspectos epidemiológicos referente à origem dos isolados de *K. pneumoniae* provenientes de quatro hospitais de Maceió, AL.

Hospital	ID	Isolamento	Sector de origem	Origem da cultura
A	AR11	06/06/2018	Nefrologia	Secreção de ferida
A	AR19	11/06/2018	Enfermaria	Ponta de cateter
A	AR20	15/06/2018	UTI cardiológica	Ponta de cateter
A	AR29	23/06/2018	Enfermaria 4º andar	Urina
A	AR34	02/07/2018	UTI geral	Urina
A	AR43B	18/06/2018	UTI geral	Urina
A	AR46	18/06/2018	UTI geral	Sangue
A	AR54	08/08/2018	UTI Neuro	Secreção traqueal
A	AR60	29/08/2019	UTI cardiológica	Urina
A	AR61	03/09/2018	UTI geral	Pele
A	AR71	12/09/2018	Enfermaria 4º andar	Urina
A	AR73A	12/09/2018	Enfermaria 4º andar	Urina
A	AR79	16/09/2018	Enfermaria 4º andar	Urina
A	AR81	04/10/2019	Enfermaria 2º andar	Fragmento de tecido calcaneal
A	AR82	04/10/2018	UTI cardiológica	Ponta de cateter
A	AR83A	05/10/2018	Enfermaria 2º	Urina
A	AR88A	INO*	INO*	INO*
A	AR89	INO*	INO*	INO*
A	AR90	INO*	INO*	INO*
A	AR106	INO*	INO*	INO*
A	AR108	INO*	INO*	INO*
B	GE19	20/06/2018	Ala G	INO*
B	GE23	03/07/2018	INO*	Sangue
B	GE43	15/08/2018	AMA	Urina
B	GE46	21/08/2018	UTI	Urina
B	GE47	09/08/2018	Ala E	Urina
B	GE51	19/09/2018	INO*	Urina
B	GE55	23/09/2018	INO*	Sangue
B	GE59	02/11/2018	INO*	Urina
B	GE67	05/10/2018	INO*	Urina
B	GE68	30/10/2018	UTI	Urina
B	GE78	09/11/2018	Ala A	Urina
B	GE80	01/10/2018	Ala D	Urina
B	GE82	01/12/2018	INO*	Urina
C	DT03	14/06/2018	INO*	Urina
C	DT05	06/07/2018	INO*	Fezes
C	DT21	01/08/2018	INO*	Secreção traqueal
D	SM03	27/08/2018	UTI neonatal	Swab retal
D	SM04	19/10/2018	INO*	Swab retal
D	SM05	29/10/2018	INO*	Sangue

*INO, Informação Não Obtida

Tabela 5 Perfil de resistência dos isolados de *K. pneumoniae* obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL e suas respectivas classificações quanto aos antimicrobianos resistentes e espectro de resistência.

		Perfil de resistência observada no laboratório de origem ^a							Perfil de resistência observada no laboratório de pesquisa ^{***,a}				
Hospital	Isolado	PEN +						QUINO	CARBA	AMINO	POLI	Perfil ^b	MDR ^{****}
		TET	ATM	AMP	INIB	CEFAL							
A	AR11	R	R	R	AMC	CFL, CFO, CRX, CTX, CRO, CAZ, CPM		CIP				ESBL	Sim
A	AR19		R	R	AMC, PPT	CFL, CFO, CRO, CAZ, CPM		CIP	ERT	AMI, GEN		ESBL	Sim
A	AR20		R			CFO, CTX, CRO, CAZ, CPM						ESBL	Não
A	AR29		R	R	AMC	CFL, CRO, CAZ, CPM		CIP, NOR				ESBL	Sim
A	AR34		R	R	AMC	CFL, CRO, CAZ, CPM		CIP, NOR				ESBL	Sim
A	AR43B		R	R	AMC	CFL, CFO, CRO, CAZ, CPM		CIP, NOR	MPM, ERT	GEN		CR	Sim
A	AR46		R		AMC, PPT	CRO, CAZ, CPM			MPM, IMP, ERT	GEN		CR	Sim
A	AR54	R	R		PPT	CRO, CAZ, CPM			MPM, IMP, ERT	AMI	COL, PB	CR	Sim
A	AR60	R	R	R	AMC	CFL, CFO, CTX, CRO, CAZ, CPM			ERT			CR	Sim
A	AR61	R	R	R	AMC, PPT	CFL, CFO, CTX, CRO, CAZ, CPM			MPM, IMP, ERT	GEN		CR	Sim
A	AR71	R	R	R	AMC	CFL, CFO, CRX, CTX, CRO, CAZ, CPM				GEN	COL, PB	ESBL	Sim
A	AR73A		R	R	AMC	CFL, CFO, CRX, CTX, CRO, CAZ, CPM				GEN		ESBL	Sim
A	AR79		R		AMC	CFL, CTX, CRO, CAZ, CPM				GEN		ESBL	Sim
A	AR81	R	R	R	AMC	CFL, CRO, CAZ, CPM		CIP, LEV		GEN		ESBL	Sim
A	AR82	R	R	R	AMC, PPT	CFL, CRO, CAZ, CPM		CIP, LEV	MPM, ERT	GEN		CR	Sim
A	AR83A	R	R	R	AMC	CFL, CRO, CAZ, CPM		CIP, NOR LEV				ESBL	Sim
A	AR88A	INO*	INO*	INO*	INO*	INO*		INO*				-	DI**
A	AR89	INO*	INO*	INO*	INO*	INO*		INO*		GEN		-	DI**
A	AR90	INO*	INO*	INO*	INO*	INO*		INO*		GEN	COL, PB	-	DI**
A	AR106	INO*	INO*	INO*	INO*	INO*		INO*	MPM, IMP, ERT	GEN	PB	CR	Sim
A	AR108	INO*	INO*	INO*	INO*	INO*		INO*				-	DI**

B	GE19	R	R	AMC	CAZ	LEV				ESBL	Sim
B	GE23	R	R	AMC, PPT	CRO, CAZ, CPM	CIP, LEV				ESBL	Sim
B	GE43		R		CRO, CAZ	NOR, LEV				BLR	Sim
B	GE46				CRO, CPM		MPM, IMP, ERT	AMI, GEN		CR	Sim
B	GE47	R	R		CAZ	CIP, NOR LEV				ESBL	Sim
B	GE51				CRO, CPM		MPM, IMP, ERT	GEN	COL, PB	CR	Sim
B	GE55				CRO, CPM		MPM, IMP, ERT	GEN		CR	Sim
B	GE59				CTX, CRO	NOR				-	Não
B	GE67				CRO, CPM		MPM, IMP, ERT	GEN		CR	Sim
B	GE68				CFO					-	Não
B	GE78			AMC	CFO	NOR LEV			PB	BLR	Sim
B	GE80	R	R	R	CTX	NOR LEV	MPM	AMI		CR	Sim
B	GE82			R	AMC	CRX	MPM			CR	Sim
C	DT03			R	PPT	CFO				ESBL	Não
C	DT05	R	R	PPT	CTX, CRO, CAZ, CPM	CIP, LEV				ESBL	Sim
C	DT21	R	R		CTX, CRO, CAZ	LEV			PB	ESBL	Sim
D	SM03				CRO, CPM			GEN		ESBL	Sim
D	SM04			R	AMC	CTX	LEV	MPM	AMI	CR	Sim
D	SM05			R	PPT	CTX, CRO, CPM	LEV			BLR	Sim

*INO, Informação Não Obtida;

**DI, Dados Insuficientes;

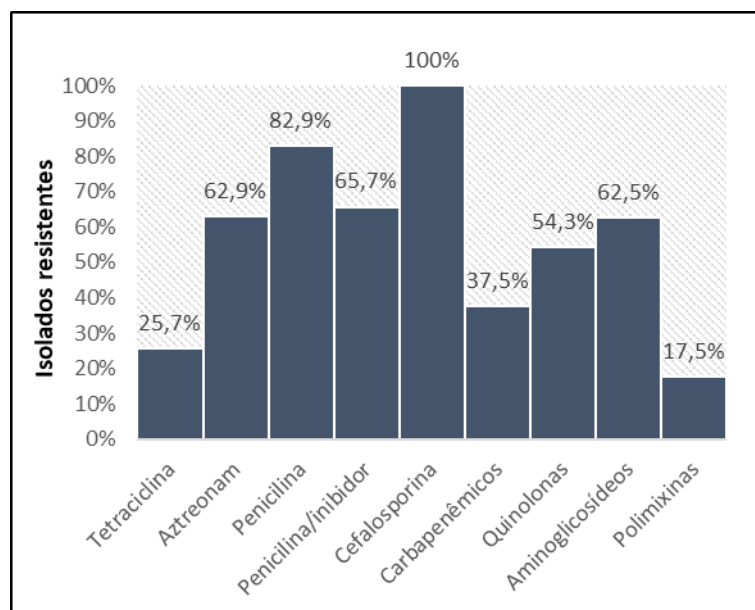
***Perfil reavaliado por disco-difusão e microdiluição em caldo;

****MDR, Multidroga-resistente: resistente a pelo menos um antimicrobiano de três classes diferentes ou mais;

^aTET, Tetraciclina; ATM, Aztreonam; PENCL, Penicilinas; PEN + INIB, Penicilina associada a um inibidor de β -lactamase; CEFAL, Cefalosporinas; QUINO, Quinolonas; CARBA, Carbapenêmicos; AMINO, Aminoglicosídeos; POLI, Polimixinas; ATM, Aztreonam; AMP, Ampicilina; AMC, Amoxicilina/ácido clavulânico; PPT, Piperacilina/tazobactam; CFL, Cefalotina; CFO, Cefoxitina; CRX, Cefuroxima; CTX, Cefotaxima; CRO, Ceftriaxona; CAZ, Ceftazidima; CPM, Cefepime; CIP, Ciprofloxacina; NOR, Norfloxacina; LEV, Levofloxacina; MPM, Meropenem; IPM, Imipenem; ERT, Ertapenem; AMI: Amicacina; GEN, Gentamicina; COL, Colistina; PB, Polimixina B.

^bESBL, β -lactamase de espectro estendido; BLR, β -lactâmico-resistente; CR, Carbapenêmico-resistente.

Gráfico 2 Porcentagem de resistência encontradas nos isolados de *K. pneumoniae* obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL, frente aos antimicrobianos de acordo com as classes.



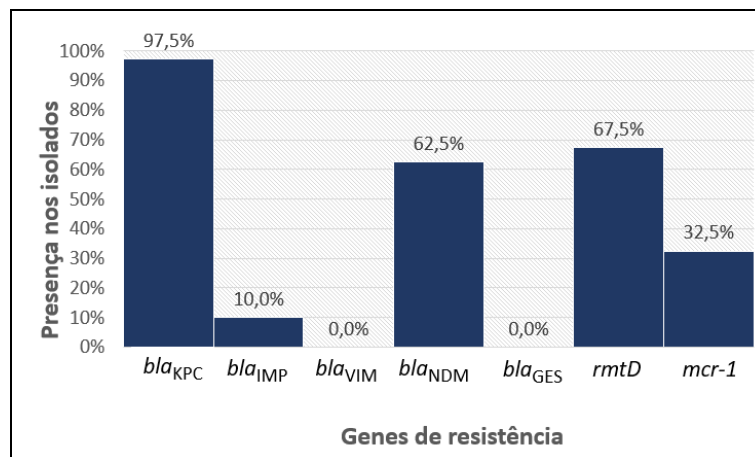
5.2 Presença dos genes de resistência

Os genes codificadores de carbapenemases *bla_{VIM}* e *bla_{GES}* não foram detectados em nenhum dos isolados, enquanto o *bla_{KPC}* esteve presente em 97,5% (39/40), o *bla_{NDM}* em 62,5% (25/40) e o *bla_{IMP-1}* em 10% (4/40) (Tabela 6; Gráfico 3). O sequenciamento dos amplicons revelou que os genes identificados codificam as carbapenemases dos tipos KPC-2 e NDM-1.

O gene *rmtD*, codificador de uma enzima 16S rRNA metiltransferase, foi encontrado em (67,5%, 27/40) dos isolados. Já o *mcr-1*, codificador de uma pEtN transferase, foi observado em (32,5%, 13/40) dos isolados (Tabela 6; Gráfico 3).

Os 25 isolados *bla_{NDM}*-positivos também possuíam o *bla_{KPC}* (100%, 25/25) e 64% (16/25) eram portadores do *rmtD*, dentre os quais, o AR81 e o GE59 continham também o *bla_{IMP-1}* (12,5%, 2/16) (Tabela 6; Gráfico 3). Paralelamente, 40% (10/25) dos isolados *bla_{NDM}*-positivos também eram portadores do *mcr-1*.

Gráfico 3 Ocorrência dos genes de resistência nos isolados de *K. pneumoniae* obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL.



5.3 Análise de mutações dos genes *pmrB* e *mgrB*

Os genes *pmrB* e *mgrB*, relacionados a resistência a polimixina, foram avaliados em nove isolados, dentre os quais, dois eram sensíveis às polimixinas e sete eram resistentes. No gene, *pmrB*, codificador da quinase sensor PmrB, foram observadas duas mutações. A primeira (T246A) trata-se de uma mutação pontual neutra e esteve presente em todas as sequências analisadas, enquanto a segunda (R256G), indicada como deletéria, foi identificada em cinco dos nove isolados analisados (Tabela 6).

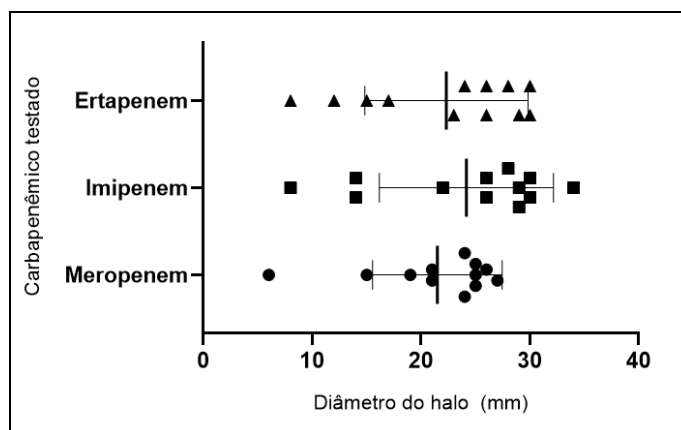
No gene *mgrB* foram encontradas mutações em dois isolados. No AR54, houve uma mutação pontual (C85T), a qual gerou o códon terminador UGA (no Leu19). E no GE51 foi observada a deleção dos 10 pares de bases (quatro aminoácidos, 44, FIPW,,) finais da sequência do *mgrB*, classificada como deletéria.

5.4 A presença dos genes e a suscetibilidade dos isolados

Entre os 39 isolados que possuíam o gene *bla*_{KPC}, 61,5% (24/39) foram sensíveis a carbapenêmicos. Dentre esses, 12 apresentaram o *bla*_{KPC} como o único gene codificador de carbapenemases. Não houve diferença significativa na suscetibilidade entre os três carbapenêmicos testados ($p = 0,654$; Gráfico 4), sendo 66,7% (8/12) sensíveis ao ertapenem, 75% (9/12) sensíveis ao meropenem e 75% (9/12) sensíveis ao imipenem. O único isolado *bla*_{KPC} negativo também não apresentou os outros genes codificadores de carbapenemase

testados e conferiu perfil ESBL, sendo sensível a todos os carbapenêmicos (Tabela 3). Tal isolado é *rmtD*-positivo com resistência a gentamicina, *mcr-1*-negativo com sensibilidade a polimixina, mas foi categorizado como MDR.

Gráfico 4 Gráfico de dispersão, no qual os pontos representam o diâmetro dos halos observados no teste de disco difusão frente ao meropenem, imipenem e ertapenem, dos isolados contendo o *bla_{KPC}* como único codificador de carbapenemase encontrado. A média e o desvio padrão estão representados na forma de barra e linha. Quanto maior o diâmetro do halo, maior a suscetibilidade do isolado ao antimicrobiano.



Ao avaliarmos se a quantidade de genes codificadores de carbapenemases influenciaram na suscetibilidade aos carbapenêmicos, podemos notar uma tendência a menores halos em isolados com dois ou três genes, quando comparados aos halos em isolados com até um gene (Gráficos 5A, 5B e 5C). Entretanto, não houve relação significativa entre as médias dos halos com o número de diferentes genes presentes (Meropenem, $p = 0,6699$; Imipenem, $p = 0,8075$; Ertapenem, $p = 0,5123$).

Dois isolados, AR81 e GE59, continham o *bla_{KPC}*, o *bla_{NDM}*, o *bla_{IMP}* e o *rmtD*. O AR81 demonstrou sensibilidade aos carbapenêmicos e a polimixina e resistência ao aminoglicosídeo gentamicina, enquanto o GE59 foi sensível às três classes (Tabela 5). Dentre os 25 isolados *bla_{NDM}*-positivos, as taxas de resistência para carbapenêmicos, aminoglicosídeos e polimixina foram 40% (10/25), 68% (17/25) e 20% (5/25), respectivamente. Não houve relação significativa entre a presença do gene *bla_{NDM}* e a resistência a carbapenêmicos ($p = 0,7458$; Gráfico 6).

Entre os 27 isolados positivos para *rmtD*, 59,3% (16/27) foram resistentes a, pelo menos, um aminoglicosídeo testado e sete (25,9%, 7/27) foram resistentes a carbapenêmicos. Em contrapartida, nove isolados resistentes a aminoglicosídeos não continham o gene *rmtD*, estando ele presente em 64% (16/25) dos isolados resistentes a aminoglicosídeos. Não foi encontrada associação entre a presença do gene *rmtD* e a resistência aos aminoglicosídeos ($p = 0,7301$; Gráfico 7).

Gráficos 5 Gráfico de dispersão, no qual os pontos representam o diâmetro dos halos observados no teste de disco difusão frente a meropenem (A), imipenem (B) e ertapenem (C), de acordo com a quantidade de genes de carbapenemases detectados nos isolados (0-1, isolados com até um gene e 2-3, isolados com dois ou três genes). A média e o desvio padrão estão representados na forma de barra e linha. Quanto maior o diâmetro do halo, maior a suscetibilidade do isolado ao antimicrobiano.

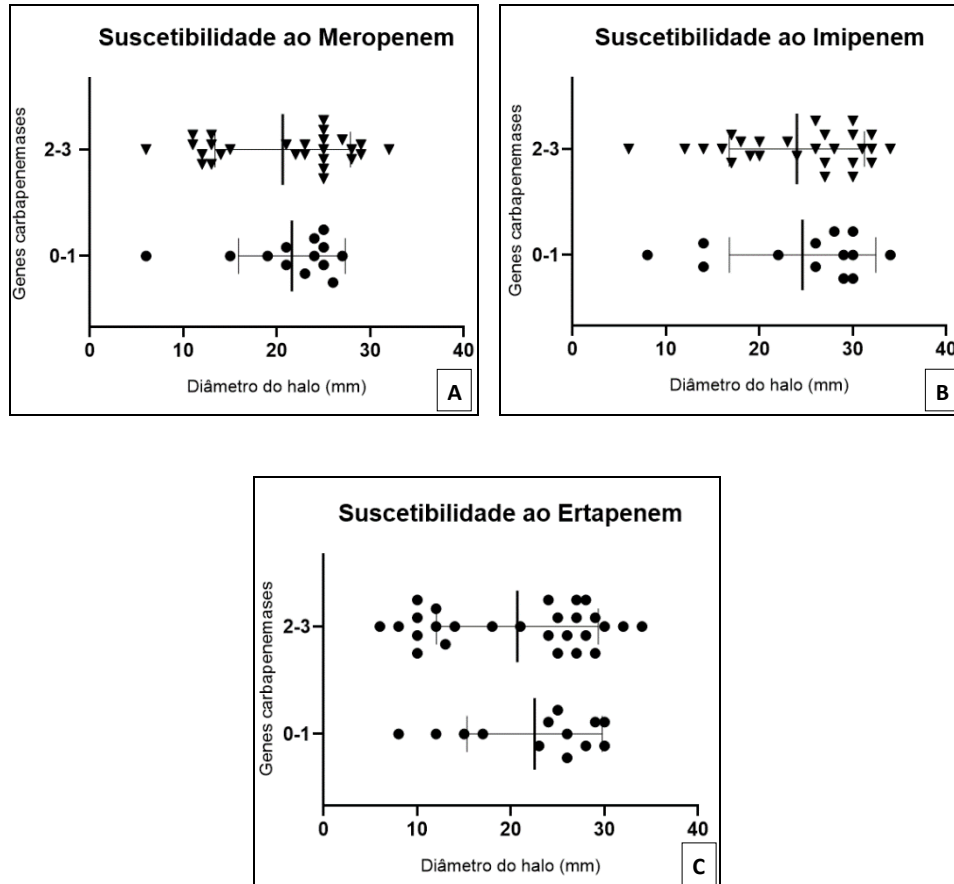
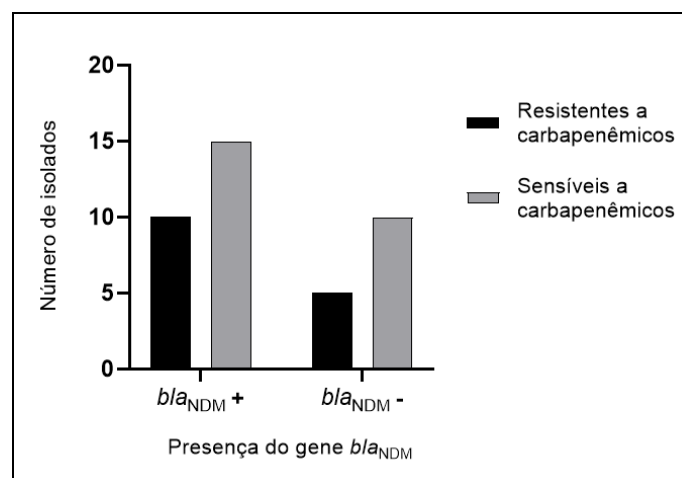
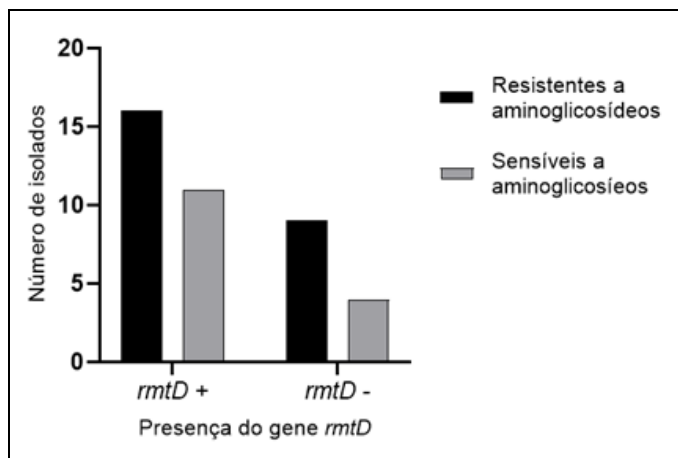


Gráfico 6 Número de isolados de *K. pneumoniae*, obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL, resistentes aos carbapenêmicos de acordo com a presença do gene *bla_{NDM}*.



bla_{NDM} +, Isolados portadores do gene *bla_{NDM}*;
bla_{NDM} -, Isolados que não possuem o gene *bla_{NDM}*.

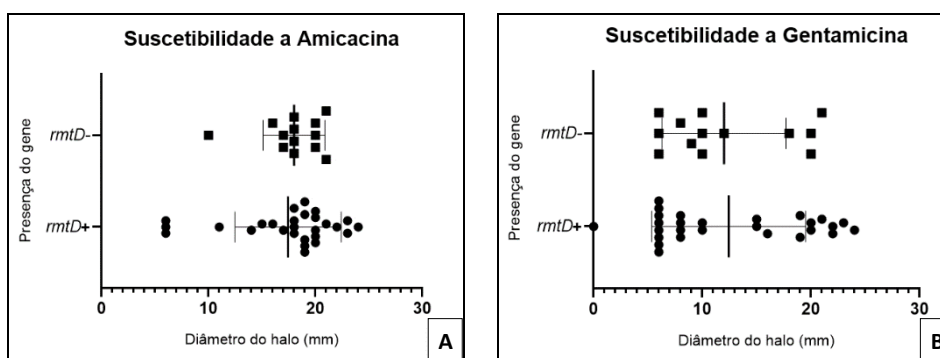
Gráfico 7 Número de isolados de *K. pneumoniae*, obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL, resistentes aos aminoglicosídeos de acordo com a presença do gene *rmtD*.



rmtD +, Isolados portadores do gene *rmtD*;
rmtD -, Isolados que não possuem o gene *rmtD*.

Entre os dois aminoglicosídeos testados, houve maior taxa de resistência a gentamicina tanto nos isolados *rmtD*-positivos (GEN, 55,6%, 15/27 contra AMI, 14,8%, 4/27), quanto nos isolados *rmtD*-negativos (GEN, 69,2%, 9/13 contra AMI, 7,7%, 1/13). A presença do gene *rmtD* não apresentou relação direta com o nível de suscetibilidade à amicacina ($P = 0,711$; Gráfico 8A) ou à gentamicina ($p = 0,8448$; Gráfico 9B).

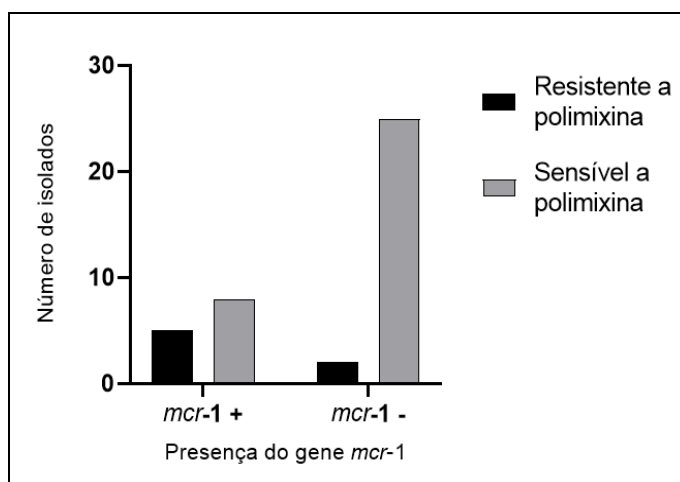
Gráfico 8 Gráfico de dispersão, no qual os pontos representam o diâmetro dos halos observados no teste de disco difusão frente a amicacina (A) e a gentamicina (B), de acordo com a presença o gene *rmtD* detectado nos isolados (*rmtD*-, isolados que não possuem o gene; *rmtD*+, isolados portadores do gene). A média e o desvio padrão estão representados na forma de barra e linha. Quanto maior o diâmetro do halo, maior a suscetibilidade do isolado ao antimicrobiano.



Dentre os isolados positivos para *mcr*-1, o AR54 mostrou outro mecanismo genético de resistência à polimixina, um códon terminador (Leu19) no gene *mgrB*. Esse mesmo isolado apresentou os maiores CIMs (COL, CIM > 16 µg/mL; PB, CIM > 16 µg/mL) dentre os resistentes ao fármaco.

Dos 13 isolados *mcr-1* positivos, apenas cinco (38,5%, 5/13) não foram suscetíveis a, pelo menos, uma polimixina, dos quais todos (100%; 5/5) foram resistentes também a amicacina e dois (40%; 2/5) foram resistentes a carbapenêmicos. Por outro lado, dentre os sete isolados, no geral, resistentes a polimixina B e/ou colistina, dois não possuíam o gene *mcr-1*, estando ele presente em cinco (71,4%, 5/7) dos isolados resistentes ao fármaco. A análise estatística mostrou uma relação significativa entre a presença do gene *mcr-1* e o fenótipo de resistência a polimixinas ($p = 0,0268$; Gráfico 9).

Gráfico 9 Associação entre isolados resistentes a polimixina e a presença do gene *mcr-1* nos isolados de *K. pneumoniae* obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL.



mcr-1 +, Isolados portadores do gene *mcr-1*;
mcr-1 -, Isolados que não possuem o gene *mcr-1*.

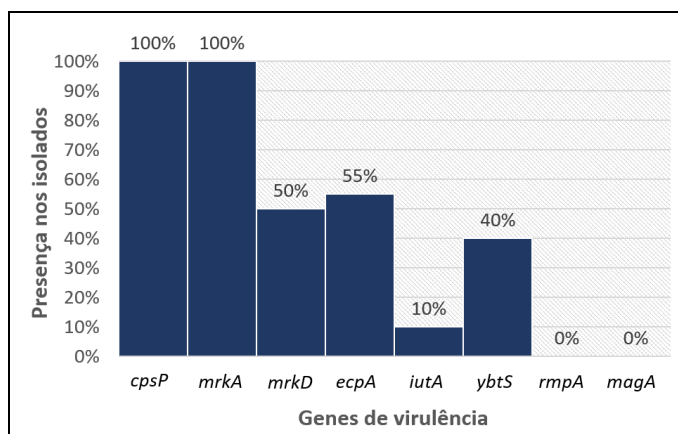
Entre os dois isolados *mcr-1*-negativos resistentes a polimixina, o GE51 apresentou deleção em 10 pb (44FIPW.) no gene *mgrB* e alto CIM frente às polimixinas (COL, CIM = 16 µg/mL; PB, CIM = 16 µg/mL). Já o DT21 apresentou uma mutação neutra (T246A) no gene *pmrB*, com CIM a colistina e polimixina B de 2 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente.

Em isolados com apenas o gene *mcr-1* como determinante de resistência a polimixina ($n = 12$), as médias dos CIMs frente a colistina e polimixina B foram de 2,13 µg/mL e 3,21 µg/mL, respectivamente.

Referente às mutações observadas no gene *pmrB*, a T246A foi identificada tanto em isolados sensíveis, quanto em isolados resistentes a polimixina. A R256G foi detectada em três isolados polimixina-resistentes/*mcr-1* - positivos e em dois polimixina-sensíveis/*mcr-1* negativos. A forma selvagem (*wild type* – WT) não foi observada em nenhum isolado (Tabela 6).

5.5 Presença dos genes de virulência

Gráfico 10 Ocorrência dos genes de resistência nos isolados de *K. pneumoniae* obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL.



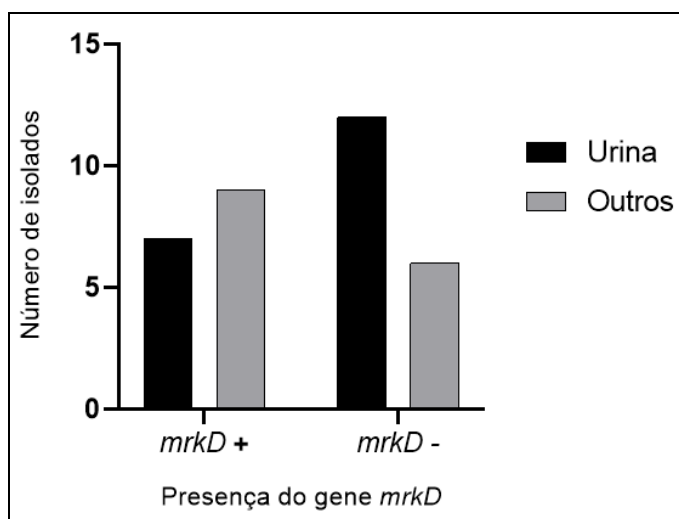
Os 40 isolados estudados apresentaram o operon gênico *cps* (Gráfico 10), responsável pela produção de cápsula polissacarídica. Da mesma forma, todos os isolados apresentaram o gene codificante da subunidade principal da fímbria tipo 3 MrkA, o *mrkA*, mas nem todos continham o gene, *mrkD*, responsável pela síntese de sua adesina MrkD (50%; 20/40; Gráfico 10). O fato do isolado ser proveniente do trato urinário não apresentou relação com a presença do gene *mrkD* ($p = 0,2998$) (Gráfico 11). Referente à prevalência do *mrkD* em isolados positivos para os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *rmtD* e *mcr-1* as taxas foram de 48,7% (19/39), 52% (13/25), 55,6% (15/27) e 69,2% (9/13), respectivamente.

O gene *ecpA*, integrante do operon responsável pela produção da fímbria tipo ECP, foi observado em 55% (22/40; Gráfico 10) dos isolados (Tabela 6), dos quais 45,5% (10/22) continham também o *mrkD*. Não foi observada correlação entre a presença desses dois genes ($p = 0,7512$). Embora a maioria dos isolados que possuem o gene *ecpA* seja proveniente de urocultura 54,5% (12/22), não existiu associação significativa entre o sítio da coleta e a presença do gene ($p = 0,4888$; Gráfico 12). Quanto a prevalência o *ecpA* em isolados contendo o *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *rmtD* e *mcr-1*, as taxas foram 53,8% (21/39), 48% (12/25), 51,9% (14/27) e 69,2% (9/13), respectivamente.

Quanto aos genes relacionados aos sideróforos, o codificador do transportador do sistema aerobactina, *iutA*, foi identificado em 10% (4/40; Gráfico 10) dos isolados, sendo todos provenientes do hospital A. O gene *ybtS*, responsável pela produção da proteína transportadora do sistema yersiniabactina, foi localizado em 40% (17/40) (Tabela 6). Nenhum isolado apresentou os genes *iutA* e *ybtS* em conjunto.

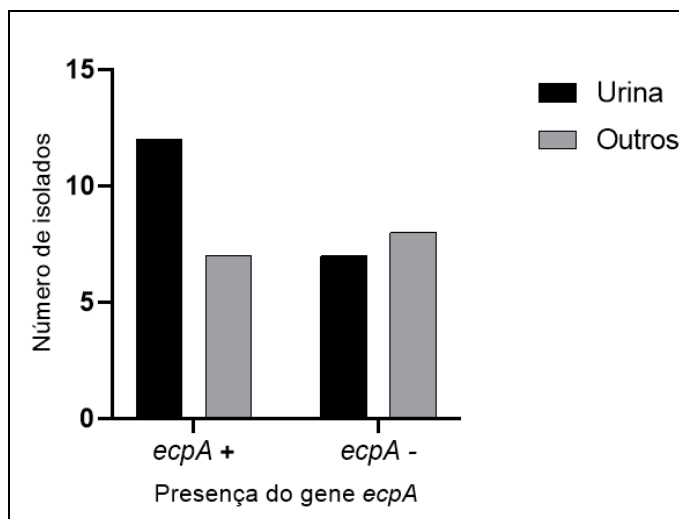
Os genes associados à hipervirulência, *magA* e *rmpA*, não foram identificados em nenhum dos isolados (Gráfico 10).

Gráfico 11 Associação do sítio de coleta com a presença do gene *mrkD* nos isolados de *K. pneumoniae* obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL.



mrkD +, Isolados portadores do gene *mrkD*;
mrkD -, Isolados que não possuem o gene *mrkD*.

Gráfico 12 Associação do sítio de coleta com a presença do gene *ecpA* nos isolados de *K. pneumoniae* obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL.



ecpA +, Isolados portadores do gene *ecpA*;
ecpA -, Isolados que não possuem o gene *ecpA*.

Tabela 6 Relação das CIMs obtidos frente aos carbapenêmicos, aminoglicosídeos e polimixinas e a presença dos determinantes genéticos de resistência e de virulência dos isolados de *K. pneumoniae* obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL.

Hospital	Isolado	CIMs (µg/mL) ^a				Perfil molecular			
		MPM (R≥4)	AMI (R≥64)	COL (R>4)	PB (R>4)	Genes de resistência	<i>pmrB</i>	<i>mgrB</i>	Genes de virulência
A	AR11	NA*	NA*	2	2	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkA</i> , <i>cpsP</i>
A	AR19	<0,5	64	1	2	<i>bla</i> _{KPC} , <i>rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>ecpA</i>
A	AR20	NA*	NA*	1	2	<i>bla</i> _{KPC} , <i>rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i>
A	AR29	NA*	NA*	1	1	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>ecpA</i>
A	AR34	NA*	NA*	2	2	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>ybtS</i>
A	AR43B	8	NA*	2	2	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} ,	NA*	NA*	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i>
A	AR46	8	NA*	1	2	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>mcr-1</i>	NA*	NA*	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>iutA</i>
A	AR54	>128	64	>16	>16	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>rmtD</i> , <i>mcr-1</i>	T246A; R256G	Leu19 ^b	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>ybtS</i> , <i>ecpA</i>
A	AR60	NT*	NA*	2	2	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>mcr-1</i>	NA*	NA*	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>ybtS</i>
A	AR61	8	NA*	1	2	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>mcr-1</i>	NA*	NA*	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>ecpA</i>
A	AR71	NA*	NA*	8	8	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>rmtD</i> , <i>mcr-1</i>	T246A; R256G	WT ^c	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>ybtS</i> , <i>ecpA</i>
A	AR73A	NA*	NA*	2	2	<i>rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>ybtS</i> , <i>ecpA</i>
A	AR79	<0,5	16	2	2	<i>bla</i> _{KPC} , <i>rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>ecpA</i>
A	AR81	NA*	NA*	2	2	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>ecpA</i>
A	AR82	8	NA*	2	2	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i>
A	AR83A	NA*	NA*	0,5	1	<i>bla</i> _{KPC} , <i>rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>ybtS</i>
A	AR88A	NA*	NA*	0,5	1	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>iutA</i>
A	AR89	NA*	32	1	2	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cps</i> ,
A	AR90	NA*	NA*	4	8	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>rmtD</i> , <i>mcr-1</i>	T246A; R256G	WT ^c	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>iutA</i> , <i>ecpA</i>
A	AR106	8	NA*	2	4	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>rmtD</i> , <i>mcr-1</i>	T246A	WT ^c	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>iutA</i> , <i>ecpA</i>
A	AR108	NA*	NA*	1	2	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>rmtD</i> , <i>mcr-1</i>	NA*	NA*	<i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>iutA</i> , <i>ecpA</i>
B	GE19	NA*	NA*	0,5	1	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} ,	NA*	NA*	<i>mrkA</i> , <i>cpsP</i>
B	GE23	NA*	16	1	2	<i>bla</i> _{KPC} , <i>rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkA</i> , <i>cpsP</i>

B	GE43	<0,5	16	2	2	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM},</i>	NA*	NA*	<i>mrkA, cpsP, ybtS, ecpA</i>
B	GE46	32	>256	2	2	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}, rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkA, cpsP, ybtS</i>
B	GE47	NA*	NA*	0,5	1	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}, mcr-1</i>	NA*	NA*	<i>mrkA, cpsP, ybtS, ecpA</i>
B	GE51	8	NA*	16	16	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	T246A	44,FIPW,, ^d	<i>mrkA, cpsP, ybtS</i>
B	GE55	8	NA*	2	2	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM},</i>	NA*	NA*	<i>mrkA, cpsP, ybtS, ecpA</i>
B	GE59	NA*	NA*	1	1	<i>bla_{KPC}, bla_{IMP}, bla_{NDM}, rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkA, cpsP, ybtS, ecpA</i>
B	GE67	4	16	2	2	<i>bla_{KPC},</i>	NA*	NA*	<i>mrkA, cpsP, ybtS, ecpA</i>
B	GE68	NA*	NA*	1	1	<i>bla_{KPC}, rmtD, mcr-1</i>	NA*	NA*	<i>mrkD, mrkA, cpsP, ybtS, ecpA</i>
B	GE78	<1	NA*	2	4	<i>bla_{KPC}, mcr-1</i>	T246A	WT ^c	<i>mrkA, cpsP, ybtS, ecpA</i>
B	GE80	32	64	1	2	<i>bla_{KPC},</i>	T246A; R256G	WT ^c	<i>mrkA, cpsP, ybtS, ecpA</i>
B	GE82	16	NA*	2	2	<i>bla_{KPC}, rmtD, mcr-1</i>	NA*	NA*	<i>mrkD, mrkA, cpsP,</i>
C	DT03	NA*	NA*	0,5	1	<i>bla_{KPC}, rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkA, cpsP, ecpA</i>
C	DT05	NA*	NA*	1	1	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}, rmtD, mcr-1</i>	NA*	NA*	<i>mrkA, cpsP, iutA</i>
C	DT21	<1	NA*	2	4	<i>bla_{KPC}, bla_{IMP},</i>	T246A	WT ^c	<i>mrkD, mrkA, cpsP, iutA</i>
D	SM03	<0,5	8	1	2	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}, rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkD, mrkA, cpsP, iutA</i>
D	SM04	16	>256	1	2	<i>bla_{KPC}, bla_{IMP}, rmtD</i>	T246A; R256G	WT ^c	<i>mrkA, cpsP, ecpA, ecpA</i>
D	SM05	NA*	NA*	1	2	<i>bla_{KPC}, rmtD</i>	NA*	NA*	<i>mrkA, cpsP, iutA</i>

^aCIM, Concentração Inibitória Mínima; MPM, meropenem; AMI, ampicilina; COL, colistina; PB, polymixina B; R, Resistência

*NA, Não Avaliado;

^bLeu19, Códon terminador após o 19º aminoácido Leucina.

^cWT, Wild Type.

^d44,FIPW,, deleção uma Fenilalanina, uma Isoleucina, uma Prolina e um Triptofano após o 44º aminoácido.

Em relação aos 6 genes de virulência pesquisados neste estudo, nenhum isolado foi detectado com todos os genes analisados. Apenas os isolados AR54, AR71, AR73A e GE68 (4/40) mostraram-se positivo para a presença dos genes *mrkD*, *mrkA*, *cpsP*, *ybtS* e *ecpA*, enquanto AR90 e AR106 (2/40) possuem *mrkD*, *mrkA*, *cpsP*, *iutA* e *ecpA*. Sendo observado uma maior ocorrência dos genes de virulências no hospital A, onde, 5 isolados 83,3%, (5/6) mostraram-se positivo. Entretanto não foi observada associação entre a quantidade de genes de virulência e o hospital A ($p = 0,7518$; Gráfico 13).

Dos seis isolados supracitados, quatro (AR54, AR71, AR90 e AR106), os quais são do hospital A, possuem os genes de resistência *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *rmtD* e *mcr-1*, sendo dois (AR54 e AR106) resistentes aos carbapenêmicos, aminoglicosídeos e polimixina (Tabela 7). Também observamos que três deles (AR54, AR71 e AR73A) puderam ser categorizados como MDR (Tabela 5). Dentre os isolados classificados como MDR ($n = 32$), oito (25%) possuem, pelo menos, quatro genes de virulência.

Tabela 7 Dados acerca dos isolados de *K. pneumoniae*, obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL, os quais continham cinco genes de virulência.

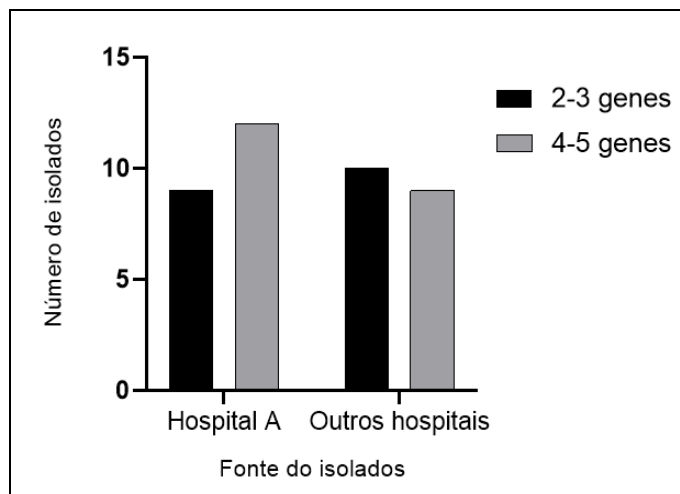
Hospital	Isolado	Origem	Resistência ^a			Determinantes de resistência	Genes de virulência
			CARB	AMINO	POLI		
A	AR54	INO*	MRM, IMP, ERT	AMI	COL, PB	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>rmtD</i> , <i>mcr-1</i> , <i>mgrB</i> (Leu19)	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>ybtS</i> , <i>ecpA</i>
A	AR71	Secreção traqueal	NHR*	GEN	COL, PB	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>rmtD</i> , <i>mcr-1</i>	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>ybtS</i> , <i>ecpA</i>
A	AR73A	Urina	NHR*	GEN	NHR*	<i>rmtD</i>	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>ybtS</i> , <i>ecpA</i>
A	AR90	Urina	NHR*	GEN	COL, PB	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>rmtD</i> , <i>mcr-1</i>	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>iutA</i> , <i>ecpA</i>
A	AR106	INO*	MRM, IMP, ERT	GEN	PB	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>rmtD</i> , <i>mcr-1</i>	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>iutA</i> , <i>ecpA</i>
B	GE68	INO*	NHR*	NHR*	NHR*	<i>bla_{KPC}</i> , <i>rmtD</i> , <i>mcr-1</i>	<i>mrkD</i> , <i>mrkA</i> , <i>cpsP</i> , <i>ybtS</i> , <i>ecpA</i>

*INO, Informação Não Obtida;

^aCARB, carbapenêmicos; MRM, meropenem; IMP, imipenem; ERT, ertapenem; AMINO, aminoglicosídeos; AMI, amicacina; GEN, gentamicina; POLI, polimixinas; COL, colistina; PB, polimixina B;

*NHR, Não houve resistência.

Grafico 13 Quantidade de genes de virulência de acordo com a fonte dos isolados de *K. pneumoniae* obtidos em quatro hospitais de Maceió, AL.



5.6 Fenótipo de Hiper mucoviscosidade

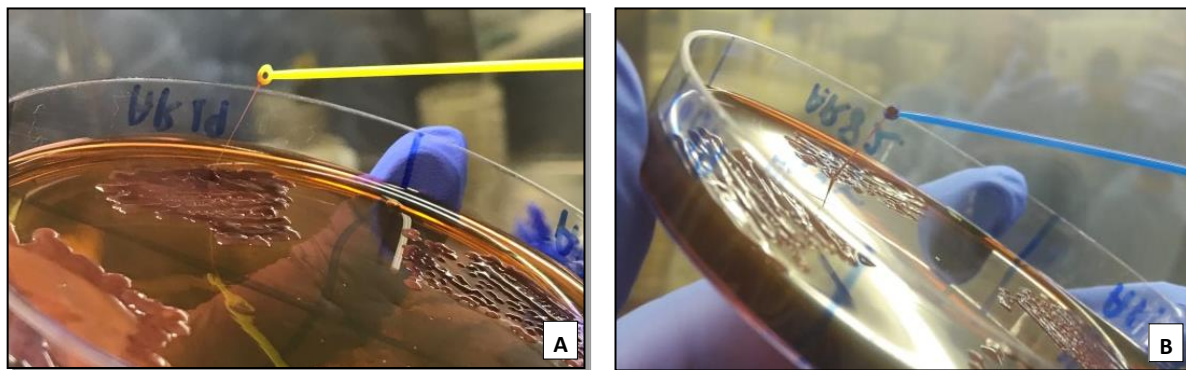
Apenas dois isolados (4,87%) apresentaram fio mucoviscoso igual ou maior que 5 mm (Figura 4), característico do fenótipo de hiper mucoviscosidade. Ambos foram obtidos de ponta de cateter, no hospital A. O AR19 foi isolado em junho de 2018 de um paciente da enfermaria, enquanto o AR82 veio de um paciente internado na UTI cardiológica em outubro do mesmo ano.

O AR19 apresentou perfil MDR com produção de carbapenemase. Sendo resistente a beta-lactâmicos de curto e amplo espectro (Tabela 3), bem como a quilonona, cefalosporinas de 1ª, 2ª, 3ª e 4ª geração, a sulfametoxazol com trimetropim, aminoglicosídeos e carbapenêmicos. Mostrando-se sensível às polimixinas.

O AR82 também apresentou perfil MDR com produção de carbapenemase, sendo resistentes a dois carbapenêmicos dos três testados (Tabela 3), a quilonona e fluorquilonona, a betalactâmicos de curto espectro, aos carbapenêmicos meropenem e ertapenem, a cefalosporinas de 1ª, 3ª e 4ª geração, a tetraciclina, a sulfametoxazol com trimetropim e ao aminoglicosídeo gentamicina. Demonstrando também sensibilidade às polimixinas.

Dessa forma, estes dois representam 6,3% (2/32) dos isolados MDR e 13,3% (2/15) dos isolados CRKP. Ambos possuem os genes de resistência *bla_{KPC}* e *rmtD* e, adicionalmente, no AR82 foi detectado a presença do gene codificador da Metallo-β-lactamase NDM-1, o *bla_{NDM-1}*. Quanto aos genes de virulência, ambos possuíam *mrkD*, *mrkA* e *cpsP*. Apenas o AR19 apresentou o gene *ecpA* e nenhum dos dois tinham o *magA* ou o *rmpA*.

Figura 4 Fenótipo hiper mucoviscoso caracterizado pela presença de um fio mucoviscoso igual ou maior que 5 mm. (A) isolado AR19; (B) isolado AR82.



Fonte: o autor

6 DISCUSSÃO

No atual trabalho, o trato urinário de pacientes foi o sítio anatômico mais acometido por *K. pneumoniae*, o que corrobora com a literatura (MARTIN e BACHMAN, 2018). Contudo, alguns trabalhos realizados no Brasil observaram a prevalência desta espécie também em amostras de swab retal (FERREIRA et al., 2019) e sangue (ROCHA et al., 2019). Nos resultados demonstrados nesse estudo, o segundo sítio de coleta mais frequente de foi o sangue e o terceiro, fezes ou swab retal.

Todos os isolados de *K. pneumoniae* analisados no atual estudo apresentaram o gene de resistência *bla*_{KPC}, com exceção de um isolado. O *bla*_{KPC} esteve presente mesmo quando a cepa não foi MDR e independe dela ser resistente ou sensível a carbapenêmicos. Sendo, ainda, observado que a maioria dos isolados demonstrou sensibilidade aos carbapenêmicos.

Peirano e colaboradores (2009) sugerem que a enzima KPC-2 não necessariamente confere resistência aos carbapenêmicos, podendo apenas reduzir a suscetibilidade. Outros autores associaram *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 a maiores taxas de resistência ao carbapenêmico ertapenem e sugeriram aos laboratórios clínicos que considerassem o uso rotineiro do teste de difusão com disco desse fármaco como indicador de *K. pneumoniae* produtora de KPC (ANDERSON et al., 2007; PEIRANO et al., 2009; RIEGER et al., 2016). No atual trabalho, observamos que a presença do gene não demonstrou influência sobre a suscetibilidade dos isolados aos carbapenêmicos e que a taxa de sensibilidade ao ertapenem em isolados que possuíam apenas o *bla*_{KPC} como codificador, identificado, de carbapenemase foi alta. Dessa forma, é possível que o gene não estava sendo expresso e mais estudos relacionando a expressão genética da enzima à suscetibilidade aos carbapenêmicos são necessários para esclarecer tais pontos.

Nesse contexto, deve ser considerado que a prevalência do *bla*_{KPC} passa despercebida nos laboratórios clínicos e provavelmente a droga a ser escolhida no tratamento frente a tais isolados, que possuem perfil ESBL, é um carbapenêmico, o que induzirá a expressão genética do *bla*_{KPC}, podendo criar uma problemática a depender da dose usada na terapêutica.

O alelo do gene *bla*_{KPC} encontrado neste estudo confere com a única variante já detectada em *K. pneumoniae* no Brasil. No país, ela foi reportada primeiramente em 2009, por Monteiro e colaboradores, cujas cepas foram isoladas em 2006 de pacientes internados em UTI de um hospital em Recife, PE. Contudo, há evidências de que *K. pneumoniae* produtora de KPC vem se disseminando pelo Brasil desde 2005 (PAVEZ et al., 2009).

Pereira e colaboradores (2013), reportaram uma cepa de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 em Alagoas, isolada em 2010. Outros trabalhos que avaliaram a ocorrência do gene na espécie, independentemente da suscetibilidade dos isolados, encontraram menores taxas de prevalência, tanto no nordeste brasileiro (FEHLBERG et al., 2012; CABRAL et al., 2012), quanto no Sul (ROZALES et al., 2014; RIEGER et al., 2016). Os resultados aqui apresentados demonstram, diferentemente dos trabalhos anteriores, uma alta prevalência do gene *bla*_{KPC} em isolados clínicos MDR no estado de Alagoas.

O segundo gene codificador de carbapenemases mais encontrado foi o codificador da metalo- β -lactamase NDM-1. Os plasmídeos que carregam o *bla*_{NDM-1} podem também conter genes codificadores de outras carbapenemases, de ESBL, de 16S RNA metiltransferases, entre outros (NORDMANN et al., 2011). No atual trabalho, além de todos os *bla*_{NDM}-positivos possuírem o *bla*_{KPC}, observou-se que a maioria também continha o gene codificador de 16S RNA metiltransferases, *rmtD*. Consequentemente, haveria uma tendência a níveis consideráveis de resistência entre isolados produtores de NDM-1. Vários autores indicam que fosfomicina, polimixina e tigeciclina são os antimicrobianos frente aos quais eles ainda possuem maior suscetibilidade (NORDMANN et al., 2011; AIRES et al., 2017b).

No atual trabalho, não foi observada influência da presença do gene *bla*_{NDM} sobre a suscetibilidade dos isolados frente aos carbapenêmicos, sugerindo que, em alguns isolados, o gene não estava sendo expresso e, consequentemente, a carbapenemases NDM-1 não estava sendo produzida. Assim, nesses casos, pode ocorrer a mesma problemática levada em consideração para isolados que possuem o gene *bla*_{KPC} que não estão sendo expresso.

No Brasil, o primeiro registro de *K. pneumoniae* produzindo NDM-1 foi em 2013, simultaneamente no Rio de Janeiro e em Brasília (CARNEIRO et al., 2013), desde então, *K. pneumoniae* portando *bla*_{NDM} já foi detectada em São Paulo (FERREIRA et al., 2016), Bahia (BARBERINO et al., 2017) e Pernambuco (SCAVUZZI et al., 2019).

A produção de KPC-2 juntamente com NDM-1 foi detectada em *K. pneumoniae* pela primeira vez em 2010 na Índia (KUMARASAMY e KALYANASUNDARAM, 2012). Tal associação dificilmente é reportada em *K. pneumoniae*, tendo sido, no Brasil, encontrada por Aires e colaboradores (2017b) em dois dentre 16 isolados produtores de NDM-1. Em nosso trabalho, apesar da prevalência preocupante na coexistência de genes codificadores de carbapenemase, o número de genes não demonstrou influenciar a suscetibilidade aos carbapenêmicos.

Normann e colaboradores (2011) comentam que resistência de baixo nível e suscetibilidade a carbapenêmicos foram observadas em produtores de qualquer tipo de carbapenemases, indicando que a busca por produtores de carbapenemase deve ser feita para qualquer isolado de Enterobacteriaceae com menor suscetibilidade a carbapenêmicos (THOMSON, 2010; NORDMANN et al., 2011). Neste estudo, foram observados isolados que não demonstraram qualquer redução na suscetibilidade aos carbapenêmicos apresentando gene codificador de carbapenemase.

Foi encontrada uma frequência relativamente alta na presença do gene *rmtD*, cuja maioria dos isolados apresentaram resistência a aminoglicosídeos. No Brasil, o gene *rmtD* foi inicialmente encontrado em *Pseudomonas aeruginosa* (DOI et al., 2007). Em *K. pneumoniae*, o gene já foi detectado em isolados de São Paulo (BUENO et al., 2013) e da Bahia (YAMANE et al., 2008). Em ambos os casos, as CIMs foram consideravelmente altas frente aos aminoglicosídeos testados. No atual estudo, nem todos os isolados *rmtD*-positivos apresentaram resistência aos aminoglicosídeos e a presença do gene não teve relação com a suscetibilidade a amicacina e/ou gentamicina, provavelmente porque nove isolados possuíam resistência aos aminoglicosídeos, mas eram *rmtD*-negativos.

Referente aos determinantes genéticos de resistência a polimixina, foram observadas mutações nos genes *pmrB* e *mgrB*, bem como a presença do gene plasmidial *mcr-1*. Dentre as mutações observadas no gene *pmrB*, a T246A já foi observada anteriormente por Aires e colaboradores (2016) em isolados de *K. pneumoniae* sensíveis ao fármaco. Dessa forma, conforme a atual análise e a literatura, tal mutação possui característica neutra, não causando interferência na suscetibilidade da cepa a polimixina.

A segunda mutação (R256G), classificada como deletéria, já foi encontrada em cepas de *K. pneumoniae* por outros autores, tanto em cepas resistentes (HAEILI et al., 2017; WANG et al., 2017; WU et al., 2019) quanto em cepas sensíveis a polimixina (AIRES et al., 2016). Haeili e colaboradores (2017) observaram que a complementação com o gene *pmrB* WT não foi capaz de restaurar a suscetibilidade à colistina em isolados caracterizados com

essa alteração no *pmrB*. Do mesmo modo, Cheng e colaboradores (2015) observaram que mesmo revertendo a mutação no isolado estudado, a CIM para colistina não se alterou. Os autores sugerem que outros mecanismos, talvez em associação a essa mutação, estão contribuindo para a resistência, nesse caso. Os valores das CIMs observados neste estudo corroboram a hipótese de que a mutação R256G por si só não é capaz de conferir resistência a polimixina.

A mutação pontual que levou à inativação o *mgrB* pelo códon terminador UGA, em isolados de *K. pneumoniae* no presente estudo, também foi detectada por Colan e colaboradores (2017) na *K. pneumoniae* AR_0125, cuja sequência está depositada no Genbank com o número de acesso CP021859.1. Em sua descrição, os autores citam a presença do terminador interno. Já a deleção observada não está descrita na literatura, sendo observada pela primeira vez neste trabalho.

A ocorrência do *mcr-1* associada à inativação do *mgrB*, em isolados de *K. pneumoniae*, acarretou um CIM, frente às polimixinas maior quando comparado aos isolados portadores apenas do *mcr-1* em nosso estudo, bem como e em outros estudos (LIU et al., 2016; OLITAN et al., 2016; ROLAIN et al., 2016). Tal observação foi relatada anteriormente por Rolain e colaboradores (2016). Em paralelo, a inativação do *mgrB* por si só também apresentou maior CIM quando comparado aos portadores do *mcr-1* sozinho. Embora a média dos CIMs frente à polimixina observados nos isolados *mcr-1*-positivos tenha sido mais baixa que o ponto de corte que confere resistência ao fármaco, a presença do gene apresentou relação direta com a resistência às polimixinas.

Entretanto, pôde-se observar que mesmo na presença do *mcr-1*, isolados necessitaram de mutação no *mgrB* para que o CIM frente à polimixina aumentasse, provavelmente porque estavam sendo expostos ao fármaco e aparentemente apenas o plasmídeo pode não ser o suficiente para a sua sobrevivência.

Ademais, o *mcr-1* foi identificado em isolados *bla*_{NDM}-positivos. Isolados clínicos de *K. pneumoniae* produzindo MCR-1, juntamente com carbapenemase do tipo NDM foram identificados na Ásia (DU et al., 2016; SRIJAN et al., 2018) mas até a data, esse é o primeiro relato de um isolado clínico de *K. pneumoniae* abrigando os genes *bla*_{NDM} e *mcr-1* na América do Sul. Da mesma forma, este é o primeiro relato de *mcr-1* ocorrendo em *K. pneumoniae* no nordeste brasileiro.

No atual estudo foi detectada uma ocorrência absoluta para os genes referentes à capsula polissacarídica e à unidade principal das fímbrias do tipo 3. Esse resultado é comum em *K. pneumoniae* (ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013; BECKER et al., 2018), pois se trata

de genes cromossomais e estão majoritariamente presentes na espécie (CLEGG e MURPHY, 2016). Entretanto o gene *mrkA* pode ter sido perdido em cepas não formadoras biofilme (SHIVAE et al., 2019).

No atual estudo, o gene *mrkD* não foi detectado em todos os isolados, demonstrando que a adesina MrkD não está necessariamente presente em todas as fímbrias do tipo 3. Observação também realizada por Alcántar-Curiel e colaboradores (2013). O MrkD está relacionado a produção de biofilme em infecções urinárias, todavia não foi encontrada relação do gene *mrkD* com o sítio da cultura. Paralelamente, os isolados provenientes de ponta de cateter continham o gene *mrkD*, apesar de que a produção de biofilmes com o auxílio de fímbrias do tipo 3 em superfícies abióticas, pode ocorrer independentemente da presença da adesina MrkD (LANGSTRAAT et al., 2001).

No atual trabalho, embora a maioria dos isolados tenha apresentado o gene relacionado a fímbrias do tipo ECP, estudos anteriores encontraram uma maior prevalência do gene *ecpA* em *K. pneumoniae* (ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013; SHIVAE et al., 2019). Ainda, sua frequência pode ser maior em isolados produtores de biofilme e entre cepas hipervirulentas (OSTRIA-HERNANDEZ et al., 2017; ARAÚJO et al., 2018; SHIVAE et al., 2019).

Alcántar-Curiel e colaboradores (2013) encontraram coprodução importante de MrkD e ECP em isolados e *K. pneumoniae* produtores de biofilme em células epiteliais. Nos isolados analisados neste, a presença do gene *mrkD* não foi predominante entre *ecpA*-positivos, tampouco encontramos relação estatística entre a presença dos dois genes. Entretanto, sugere-se que os isolados que contendo ambos os genes, são potenciais formadores de biofilme em tecido epitelial.

A frequência do gene relacionado ao sistema sideróforo aerobactina foi baixa, o que é comum entre isolados cKP (LAM et al., 2018b), sendo sua prevalência associada a cepas hvKP (LIU e GUO, 2019; TAN et al., 2019). Já o sistema yersiniabactina teve uma prevalência maior, cujo frequência foi similar à encontrada por Lam e colaboradores (2018a). Tais autores comentam que o sistema yersiniabactina estava presente particularmente em cepas invasivas. Embora não tenha sido encontrado nenhum isolado contendo ambos os genes de aerobactina e yersiniabactina, neste estudo, tanto a presença do sistema yersiniabactina quanto do sistema aerobactina poderia indicar um aumento na capacidade de invasividade dessas cepas que já possuem alto nível de resistência a antimicrobianos.

Dois isolados que portavam cinco genes de virulência apresentaram resistência a carbapenêmicos, aminoglicosídeos e polimixina. Ambos possuíam os genes de resistência *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *rmtD* e *mcr-1*.

No atual estudo, foram observados dois isolados com fenótipo de hipermucoviscosidade que possivelmente não são variantes hvKP. Embora os termos hipervirulência e hipermucoviscosidade muitas vezes tenham sido utilizados como sinônimos, a sensibilidade e especificidade do teste do fio hipermucoviscoso para cepas hvKP não está bem definido, uma vez que cKP também podem apresentar resultado positivo (RUSSO et al., 2015). Adicionalmente, estudos recentes sugerem que o fenótipo HMV sozinho não infere uma condição de hipervirulência e que variantes hvKP que não expressam o fenótipo HMV ainda sim causam infecções invasivas em pessoas saudáveis (CATALÁN-NÁJERA et al., 2017). Assim, Catalán-Nájera e colaboradores (2017) sugerem que a hipermucoviscosidade e a hipervirulência são dois fenótipos distintos.

Nesse contexto, análises baseadas em tipagem e sorotipos têm sido avaliadas para identificar clones hvKP (e.g.: FANG et al., 2007; BRISSE et al., 2009; BIALEK-DAVENET et al., 2014; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2019). Todavia, essa forma de diferenciar variantes hipervirulentas das clássicas também é imperfeita, pois esses sorotipos ou tipos clonais não necessariamente vão apresentar os genes que, em conjunto, conferem uma hipervirulência (RUSSO e MARR, 2019).

Russo e Marr (2019) sugerem que um plasmídeo contendo o *iuc* e o *rmpA* e/ou *rmpA2* contribui para o perfil de hipervirulência em *K. pneumoniae*. Inclusive, Yu e colaboradores (2008) já tinham observado que a presença do sistema aerobactina, cujas proteínas são codificadas pelo *cluster* gênico *iuc*, está estatisticamente associado ao gene *rmpA*. A função do *rmpA* e do *rmpA2* parece ser redundante, pois a presença de apenas um deles é suficiente para conferir hipervirulência, em contra partida, apenas o *rmpA2* parece conferir o fenótipo HMV (RUSSO e MARR, 2019). O *rmpA2* não foi pesquisado em nosso estudo.

No atual estudo, nenhum dos dois isolados com fenótipo de hipermucoviscosidade apresentaram o sistema sideróforo aerobactina, tampouco o gene *rmpA* ou relação com o sorotipo K1, e ambos possuíam multidroga-resistência com perfil de produtores e carbapenemases. Paralelamente, foram encontrados quatro isolados contendo gene relacionado ao sistema aerobactina, mas que não possuíam o gene *rmpA*, nem o *magA*.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo, sendo abrangente acerca da epidemiologia molecular em isolados MDR de *K. pneumoniae* em Alagoas, é pioneiro no estado. Pôde-se observar uma frequência quase absoluta do gene codificador de KPC-2 e uma alta prevalência de outros genes de resistência, o que é alarmante para a saúde pública local. Ademais, foi encontrada uma frequência preocupante na coexistência dos genes codificadores de carbapenemases, bem como sua associação aos genes *rmtD* e *mcr-1*. A coexistência do *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}, que é rara na literatura, foi comum nos resultados.

Observou-se que a presença do plasmídeo *mcr-1* sozinho acarreta baixa suscetibilidade à polimixina, entretanto pode não ser suficiente para a sobrevivência da colônia bacteriana, sendo, provavelmente, a desativação do gene *mgrB* uma medida emergencial diante da exposição ao fármaco. Paralelamente, enquanto mutações no gene *mgrB* têm alta eficácia, mutações no gene *pmrB* parecem não ser tão eficientes em reduzir a suscetibilidade da cepa frente a polimixina.

Foi encontrado, pela primeira vez no nordeste brasileiro, o gene *mcr-1* em isolados de *K. pneumoniae*. Adicionalmente, foi observado, pela primeira vez na América do Sul e segunda vez no mundo, cepas de *K. pneumoniae* portadoras do *mcr-1* e *bla*_{NDM}. Essa coexistência permite um fenótipo de panresistência, contra o qual a colistina e os β -lactâmicos-inibidores de β -lactamase tornam-se ineficazes. A possibilidade de sua disseminação representa um desafio à terapia clínica e estratégias no controle de infecções.

Genes codificadores e carbapenemase, 16S RNA metiltransferase e pEtN transferase podem estar presentes mesmo na ausência de resistência aos fármacos. Portanto, sugere-se que a busca por genes produtores de enzimas que conferem resistência a antimicrobianos devem ser empregadas não só em caso de redução da suscetibilidade e/ou resistência, como normalmente é realizado, mas também em isolados multidroga-resistentes com sensibilidade ao fármaco de escolha. Ademais, estudos envolvendo análise de expressão gênica aliados à detecção dos genes envolvidos na resistência, podem dispor de dados complementares para compreender mais profundamente a resistência bacteriana.

A produção de cápsula e fímbrias do tipo 3 parecem ser comuns em cKP MDR e fímbrias do tipo 3 ocorrem também sem a adesina MrkD. Sugere-se, assim, que a busca pelo gene *mrkD* não é a metodologia ideal para detectar a presença desse tipo fímbrial.

Foi encontrada uma frequência levemente aumentada na presença do gene relacionado ao sistema sideróforo yersiniabactina em isolados MDR. Complementarmente, isolados MDR foram identificados contendo diferentes genes de virulência. Dessa forma, o quadro infeccioso, considerado grave, devido ao aumento da virulência induzido pela presença dos diferentes fatores pesquisados, poderá se prolongar em consequência da dificuldade terapêutica imposta pela resistência da cepa, aumentando os riscos de morbidade e mortalidade do paciente.

Ademais, os resultados indicam que o fenótipo de hipermucoviscosidade encontrado em nosso trabalho não está associado a condição de hipervirulência, corroborando a hipótese de que HMV e hvKP são perfis independentes.

REFERÊNCIAS

- AIRES, Caio Augusto Martins et al. *mgrB* mutations mediating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal surveillance swabs in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6969-6972, 2016.
- 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, 2017a.
- AIRES, Caio Augusto Martins et al. Multiclonal expansion of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. e01048-16, 2017b.
- AMBLER, R.P. The structure of β -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**. Series B, Biological Sciences, p. 321-331, 1980.
- ALCÁNTAR-CURIEL, María D. et al. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 129-138, 2013.
- ARAÚJO, Bruna Fuga et al. Hypervirulence and biofilm production in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil. **Journal of medical microbiology**, v. 67, n. 4, p. 523-528, 2018.
- ARES, Miguel A. et al. H-NS nucleoid protein controls virulence features of *Klebsiella pneumoniae* by regulating the expression of type 3 pili and the capsule polysaccharide. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 13, 2016.
- BARBERINO, Maria Goreth et al. Isolation of *bla*_{NDM}-producing Enterobacteriaceae in a public hospital in Salvador, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 47-50, 2018.

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

BECKER, Laura et al. Genome-based analysis of Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from German hospital patients, 2008-2014. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 62, 2018.

BIALEK-DAVENET, Suzanne et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 11, p. 1812, 2014.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Plano de Ação da Vigilância Sanitária em resistência aos antimicrobianos**. Brasília, (DF), 2018. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/3487091/3697444/Plano+de+a%C3%A7%C3%A3o+da+vigil%C3%A2ncia+sanit%C3%A1ria/09f85d62-bc23-4ccf-8c86-0a6431a355f9>. Acesso em: 17 dez. 2019

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 17: Avaliação dos indicadores nacionais das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e resistência microbiana do ano de 2017**. Brasília, (DF), 2017. Disponível em:
<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/category/boletins-estatisticos>. Acesso em: 10 out. 2019.

BRISSE S, GRIMONT F, GRIMONT P. The genus *Klebsiella*. In: **The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria**, 3rd edition, eds Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (Springer, New York), 3rd Ed. Vol 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. 2006.

BRISSE, Sylvain et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. **PloS one**, v. 4, n. 3, 2009.

BROCK, J. H. et al. Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and enterochelin-producing strains of *Escherichia coli* and to other microorganisms. **Infection and immunity**, v. 59, n. 9, p. 3185-3190, 1991.

BUSH, K., Past and present perspectives on β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 10, p. e01076-18, 2018.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

CABRAL, Adriane Borges et al. Multidrug resistance genes, including *bla_{KPC}* and *bla_{CTX-M-2}*, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 572-578, 2012.

CARNEIRO, Marcelo et al. New carbapenases in Brazil. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 12, n. 2, p. 155-156, 2014.

CATALÁN-NÁJERA, Juan Carlos; GARZA-RAMOS, Ulises; BARRIOS-CAMACHO, Humberto. Hypervirulence and hypermucoviscosity: two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes?. **Virulence**, v. 8, n. 7, p. 1111-1123, 2017.

CHENG, Yi-Hsiang et al. Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2909-2913, 2015.

CLEGG, Steven; MURPHY, Caitlin N. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 1, 2016.

CRESS, Brady F. et al. Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. **FEMS microbiology reviews**, v. 38, n. 4, p. 660-697, 2014.

DALMOLIN, Tanise Vendruscolo et al. Acquisition of the mcr-1 gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 90, n. 2, p. 132-133, 2018.

DOI, Yohei et al. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 852-856, 2007.

DOI, Yohei; WACHINO, Jun-ichi; ARAKAWA, Yoshichika. Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 2, p. 523-537, 2016.

EL FERTAS-AISSANI, R. et al. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. **Pathologie-biologie**, 5 dez. 2012.

FANG, Chi-Tai et al. *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. **Clinical infectious diseases**, v. 45, n. 3, p. 284-293, 2007.

FANG, Dong et al. Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. **Chinese medical journal**, v. 121, n. 17, p. 1611-1616, 2008.

FANG, Chi-Tai et al. The function of wzy_K1 (magA), the serotype K1 polymerase gene in *Klebsiella pneumoniae* cps gene cluster. **J Infect Dis**, v. 201, n. 8, p. 1268-1269. 2010.

FEHLBERG, Lorena CC et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 577-580, 2012.

FERREIRA, A. M. et al. First report of a clinical isolate of New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 1, p. 73-74, 2016.

FERREIRA, Roumayne L. et al. High prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β -lactamase encoding genes in a Brazilian intensive care unit. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 3198, 2019.

FLO, Trude H. et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 917, 2004.

GARNETT, James A. et al. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 10, p. 3950-3955, 2012.

GERLACH, Gerald-F.; CLEGG, STEVEN; ALLEN, BRADLEY L. Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 3, p. 1262-1270, 1989.

HAEILI, Mehri et al. MgrB alterations mediate colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Iran. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2470, 2017.

HAGIYA, Hideharu et al. Clinical utility of string test as a screening method for hypermucoviscosity-phenotype *Klebsiella pneumoniae*. **Acute medicine & surgery**, v. 1, n. 4, p. 245-246, 2014.

HENNEQUIN, Claire; FORESTIER, Christiane. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. **Research in microbiology**, v. 158, n. 4, p. 339-347, 2007.

HENNEQUIN, Claire; FORESTIER, Christiane. oxyR, a LysR-type regulator involved in *Klebsiella pneumoniae* mucosal and abiotic colonization. **Infection and immunity**, v. 77, n. 12, p. 5449-5457, 2009.

HIGASHINO, Hermes Ryoiti et al. Colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* co-harboring KPC and MCR-1 in a Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit. **Bone marrow transplantation**, v. 54, n. 7, p. 1118-1120, 2019.

HOLDEN, Victoria I.; BACHMAN, Michael A. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. **Metallomics**, v. 7, n. 6, p. 986-995, 2015.

HOLT, Stanley C. et al. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontology** 2000, v. 20, n. 1, p. 168-238, 1999.

HOLT, Kathryn E. et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public

health. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 27, p. E3574-E3581, 2015.

JAGNOW, Jennifer; CLEGG, Steven. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix-and collagen-coated surfaces. **Microbiology**, v. 149, n. 9, p. 2397-2405, 2003.

JEANNOT, Katy; BOLARD, Arnaud; PLESIAT, Patrick. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. **International journal of antimicrobial agents**, v. 49, n. 5, p. 526-535, 2017.

KAYE, Keith S. et al. Agents of last resort: polymyxin resistance. **Infectious disease clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 391-414, 2016.

KLEMM, Per; SCHEMBRI, Mark A. Bacterial adhesins: function and structure. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, n. 1, p. 27-35, 2000.

KOHLER, Philipp P. et al. Carbapenem resistance, initial antibiotic therapy, and mortality in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: a systematic review and meta-analysis. **infection control & hospital epidemiology**, v. 38, n. 11, p. 1319-1328, 2017.

KONEMAN, E.W.; ALLE, N S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 7ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

LAM, Margaret MC et al. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. **Microbial genomics**, v. 4, n. 9, 2018a.

LAM, Margaret MC et al. Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. **Genome medicine**, v. 10, n. 1, p. 77, 2018b.

LAWLOR, Matthew S.; O'CONNOR, Christopher; MILLER, Virginia L. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. **Infection and immunity**, v. 75, n. 3, p. 1463-1472, 2007.

LEE, Chen-Hsiang et al. Sialic acid involved in hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* and associated with resistance to neutrophil phagocytosis. **Virulence**, v. 5, n. 6, p. 673-679, 2014.

LIVERMORE, David M.; SEFTON, Armine M.; SCOTT, Geoffrey M. Properties and potential of ertapenem. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 331-344, 2003.

LIU, Yung-Ching; CHENG, Deh-Lin; LIN, Chia-Lee. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. **Archives of internal medicine**, v. 146, n. 10, p. 1913-1916, 1986.

LIU, Chao; GUO, Jun. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hypermucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China: antimicrobial resistance patterns, molecular epidemiology and risk factor. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 18, n. 1, p. 4, 2019.

MARTIN, Rebekah M.; BACHMAN, Michael A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 4, 2018.

MELETIS, G., Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. **Therapeutic advances in infectious disease**, v. 3, n. 1, p. 15-21, 2016.

MIETHKE, Marcus; MARAHIEL, Mohamed A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 71, n. 3, p. 413-451, 2007.

MIGLIAVACCA, Roberta et al. Simple microdilution test for detection of metallo- β -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4388-4390, 2002.

MIZUTA, K. et al. Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types. **Infection and Immunity**, v. 40, n. 1, p. 56-61, 1983.

MONTEIRO, Jussimara et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333-334, 2009.

NAMIKAWA, Hiroki et al. Two unusual cases of successful treatment of hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* invasive syndrome. **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 680, 2016.

NANG, Sue C.; LI, Jian; VELKOV, Tony. The rise and spread of mcr plasmid-mediated polymyxin resistance. **Critical reviews in microbiology**, v. 45, n. 2, p. 131-161, 2019.

NETO, Lauro Vieira Perdigão et al. Simultaneous colonization by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* harboring mcr-1 in Brazil. **Infection**, p. 1-4, 2019.

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

OSTRIA-HERNANDEZ, Martha Lorena et al. Nosocomial, Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from Mexico City produce Robust Biofilms on abiotic surfaces but not on Human Lung Cells. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 4, p. 422-433, 2018.

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.

PACZOSA, Michelle K.; MECSAS, Joan. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016.

PAVEZ, Mónica; MAMIZUKA, Elsa M.; LINCOPAN, Nilton. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2702-2702, 2009.

PFEIFER, Yvonne et al. Molecular characterization of bla NDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 9, p. 1998-2001, 2011.

POIREL, Laurent et al. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 622-632, 2000.

POIREL, Laurent; JAYOL, Aurelie; 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.

RIEGER, A. et al. Update on monitoring the spread of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella* spp. in South Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 92, n. 1, p. 107-108, 2016.

ROCHA, Francisco Ruliglésio et al. High Frequency of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Strains Isolated from a Teaching Hospital in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 6, p. 909-914, 2019.

RODLOFF, A. C.; GOLDSTEIN, E. J. C.; TORRES, A. Two decades of imipenem therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 916-929, 2006.

ROLAIN, Jean-Marc et al. Plasmid-mediated mcr-1 gene in colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in France and Laos. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6994-6995, 2016.

ROZALES, Franciéli P. et al. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 79-81, 2014.

RUSSO, Thomas A. et al. Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* *ex vivo* and *in vivo*. **Infection and immunity**, v. 83, n. 8, p. 3325-3333, 2015.

RUSSO, Thomas A.; MARR, Candace M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 3, p. e00001-19, 2019.

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

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.

SEBGHATI, Tricia A. Schurtz et al. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. **Infection and immunity**, v. 66, n. 6, p. 2887-2894, 1998.

SCHROLL, Casper et al. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 179, 2010.

SHIVAE, Ali et al. Prevalence of *flmA*, *flmH*, *mrkA*, *ecpA*, and *mrkD* virulence genes affecting biofilm formation in clinical isolates of *K. pneumoniae*. **KAUMS Journal (FEYZ)**, v. 23, n. 2, p. 168-176, 2019.

SHON, Alyssa S.; BAJWA, Rajinder PS; RUSSO, Thomas A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 107-118, 2013.

SILVA, Kesia Esther et al. Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates from an outbreak in a Brazilian teaching hospital. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 7, p. 2324-2328, 2015.

SMITH, Kelly D. Iron metabolism at the host pathogen interface: lipocalin 2 and the pathogen-associated *iroA* gene cluster. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 10, p. 1776-1780, 2007.

SRINIVAS, Pavithra; RIVARD, Kaitlyn. Polymyxin resistance in Gram-negative pathogens. **Current infectious disease reports**, v. 19, n. 11, p. 38, 2017.

TAN, Thean Yen et al. Hypermucoviscosity, *rmpA*, and aerobactin are associated with community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremic isolates causing liver abscess in Singapore. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 52, n. 1, p. 30-34, 2019.

TORTORA, G.J.; CASE, C.L.; FUNKE, B.R., **Microbiologia-12ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

TRABULSI, L. Rachid; ALTERTHUM, Flavio. Microbiologia. 5ª edição. **Editora Atheneu**, 2008.

WANDERSMAN, Cécile; DELEPELAIRE, Philippe. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 58, p. 611-647, 2004.

WANG, Huabin et al. Nanomechanics measurements of live bacteria reveal a mechanism for bacterial cell protection: the polysaccharide capsule in *Klebsiella* is a responsive polymer hydrogel that adapts to osmotic stress. **Soft Matter**, v. 9, n. 31, p. 7560-7567, 2013.

WANG, Xiaojuan et al. Molecular epidemiology of colistin-resistant Enterobacteriaceae in inpatient and avian isolates from China: high prevalence of mcr-negative *Klebsiella pneumoniae*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 50, n. 4, p. 536-541, 2017.

WU, Xiaoliang et al. Genomic characterisation of a colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11 strain co-producing KPC-2, FloR, CTX-M-55, SHV-12, FosA and RmtB causing a lethal infection. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 19, p. 78-80, 2019.

YAO, Bei et al. Clinical and molecular characteristics of multi-clone carbapenem-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary hospital in Beijing, China. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 37, p. 107-112, 2015.