



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Medicina de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

Rafael Vecchi

Caracterização de mecanismos de resistência e clonalidade de isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e à polimixina B

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. James Venturini

Botucatu

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Medicina de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

Rafael Vecchi

Caracterização de mecanismos de resistência e clonalidade de isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e à polimixina B

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. James Venturini

Botucatu

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Vecchi, Rafael.

Caracterização de mecanismos de resistência e clonalidade de isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e à polimixina B / Rafael Vecchi. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: James Venturini

Capes: 40101096

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Polimixina B. 3. Resistência microbiana a medicamentos.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*; Polimixina B; Resistência antimicrobiana.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE RAFAEL VECCHI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 15 dias do mês de dezembro do ano de 2023, às 09:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de RAFAEL VECCHI, intitulada **Caracterização de mecanismos de resistência e clonalidade de isolados de Klebsiella pneumoniae resistentes aos carbapenêmicos e à polimixina B**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. JAMES VENTURINI (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul / Faculdade de Medicina (Famed), Profa. Dra. MARIA DE LOURDES RIBEIRO DE SOUZA DA CUNHA (Participação Presencial) do(a) Depto de Ciências Químicas e Biológicas / IB/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. RICARDO DE SOUZA CAVALCANTE (Participação Presencial) do(a) Depto de Infectologia, Dermatologia, Diagnóstico por Imagem e Radioterapia / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. CARLOS HENRIQUE CAMARGO (Participação Virtual) do(a) Centro de Bacteriologia / Instituto Adolfo Lutz/São Paulo, Profa. Dra. MÔNICA DA SILVEIRA (Participação Presencial) do(a) Setor de Microbiologia / Hospital Estadual de Bauru. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Decio e Maria, a quem devo tudo o que sou. Vocês são meu alicerce, meu espelho e minha inspiração. Absolutamente todas as conquistas serão sempre em seu nome, e a força para a concretização deste sonho brota da admiração que tenho por vocês.

Ao meu irmão, Vinicius, e a minha cunhada, Tamara. Agradeço imensamente o apoio e o companheirismo em todos os momentos.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora, a quem dirigi muitas preces ao longo desta caminhada, suplicando luz para os momentos difíceis e sabedoria para aqueles de êxito. É Neles em quem sempre coloco minha esperança e, com certeza, a fé não decepciona.

De maneira especial ao meu orientador, Prof. Dr. James Venturini, pela confiança em mim depositada, aceitando este desafio sem questionar qualquer de minhas iniciativas ou decisões. Agradeço por me incluir em sua equipe de pesquisa, sendo para mim motivo de imenso orgulho ser parte integrante dela.

De modo todo especial ao Dr. Carlos Henrique Camargo, do Núcleo de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, grande parceiro no desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço infinitamente pela parceria, empenho e dedicação, pelos ensinamentos e conselhos, na certeza de que, sem você, este projeto não teria passado de uma ideia, sem sair do papel. Carlos, serei eternamente grato!

Ao Hospital Estadual Bauru (HEB), especialmente a Rosilene Aparecida Floriano Cordeiro e a Regiane Daniela Alves Montier, do Núcleo de Ensino e Pesquisa, e a Fabiana Castro Pegoraro, supervisora do Laboratório de Análises Clínicas, pela parceria e suporte, tornando este projeto possível.

Aos amigos do Laboratório de Análises Clínicas do HEB, em especial a Dra. Mônica da Silveira, do setor de Microbiologia, e a Adriano de Souza Pessoa, do setor de Bioquímica, pelo companheirismo e amizade sinceros, e aos da Gerência de Riscos do Hospital Amaral Carvalho (HAC), que tão bem me acolheram em meio à pandemia e ao desenvolvimento deste projeto. Com certeza, a convivência com vocês, as palavras de ânimo e confiança, além das inúmeras risadas, se tornaram força para trilhar este árduo caminho.

Quero também deixar o meu mais sincero muito obrigado a todos aqueles que, de maneira indireta, contribuíram para a concretização deste sonho. Tantas foram as pessoas que encontrei no percurso, que acreditaram em mim, no meu trabalho, e que, com toda certeza, tornaram esta caminhada muito mais prazerosa e feliz!

Muito obrigado!

EPIGRAFE*Tudo Posso*

*Posso, tudo posso Naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos
Deixar-me guiar nos caminhos
Que Deus desejou pra mim e ali estar
Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra
mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
Do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai
chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer
E mesmo quando a visão se turva e o coração só
chora
Mas na alma, há certeza da vitória
Eu vou sofrendo, mas seguindo
Enquanto tantos não entendem
Vou cantando minha história, profetizando
Que eu posso, tudo posso em Jesus*

Celina Borges

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	11
Lista de figuras	13
Lista de quadros e tabelas	15
Resumo	16
Palavras-chave	17
Abstract	18
Keywords	19
CAPÍTULO I	20
1. Introdução	21
1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	21
1.2. Resistência aos carbapenêmicos.....	25
1.3. Resistência às polimixinas	29
1.4. Justificativa.....	36
2. Objetivos	38
2.1. Objetivo Geral	38
2.2. Objetivos Específicos	38
3. Métodos	39
3.1. Local e período do estudo.....	39
3.2. Seleção dos espécimes	39
3.3. Caracterização molecular dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos e polimixina B.....	40
3.3.1. Determinação da presença de genes plasmidiais relacionados a resistência aos carbapenêmicos e à polimixina B.....	40
3.3.2. Determinação do perfil eletroforético por técnica de PFGE.....	42
3.3.3. Sequenciamento completo do genoma bacteriano por WGS.....	43
3.4. Aspectos éticos da pesquisa.....	46
Referências	47
CAPÍTULO II	68
Title Page	69
Abstract.....	70
1. Introduction	72
2. Methods	73

2.1. Selection of specimens	73
2.2. Multiplex Polimerase Chain Reaction (PCR)	74
2.3. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)	75
2.4. Whole Genome Sequencing	77
2.5. Ethical aspects of research	79
3. Results	79
3.1. The main source of CPRKp is found in ICU settings and urine samples	79
3.2. There is a dominant clone in the hospital: cluster A, and KPC is the main carbapenem resistance.....	84
3.3. Only a single one isolate exhibited a chromossomal mutation directly related to polymyxin B resistance	87
4. Discussion.....	94
5. Conclusion	98
References.....	100
Conclusão	109
Apêndice	111
Apêndice 01	112

LISTA DE ABREVIATURAS

- **BGN** = Bacilo Gram Negativo
- **BrCAST** = do inglês, *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- **Ca²⁺** = íons cálcio
- **cgMLST** = do inglês, *core genome multilocus sequence typing*
- **CLSI** = do inglês, *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- **CPE** = enterobactéria produtora de carbapenemase
- **CPRKp** = *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e a polimixina B
- **CRE** = enterobactéria resistente aos carbapenêmicos
- **DNA** = ácido desoxirribonucleico
- **EDTA** = ácido etilenodiamino tetracético
- **ESBL** = β-lactamase de espectro estendido
- **GC%** = porcentagem das bases nitrogenadas guanina e citosina
- **HEB** = Hospital Estadual Bauru
- **ICU** = do inglês, *Intensive Care Unit*, traduzido como Unidade de Cuidados Intensivos
- **IDSA** = do inglês, *Infectious Diseases Society of America*
- **KPC** = *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
- **L-Ara4N** = 4-amino-4-deoxi-L-arabinose
- **LPS** = lipopolissacarídeo
- **MBL** = metalo-β-lactamase
- **MDR** = multidroga-resistente
- **Mg²⁺** = íons magnésio
- **MIC** = concentração inibitória mínima
- **MLST** = do inglês, *multilocus sequence typing*
- **ng/mL** = nanograma / mililitro
- **OMS** = Organização Mundial de Saúde
- **OXA** = oxacilinases
- **NDM** = *New Delhi* metalo-β-lactamase
- **nm** = nanômetro
- **pb** = pares de bases
- **PBS** = tampão fosfato-salino
- **PCR** = do inglês, *polymerase chain reaction*, traduzido como reação em cadeia da

polimerase

- **pEtN** = fosfoetanolamina
- **PFGE** = do inglês *pulsed-field gel electrophoresis*, traduzido como eletroforese em gel de campo pulsado
- **RAM** = resistência antimicrobiana
- **ST** = do inglês, *sequence type*
- **TBE** = tampão TRIS-borato EDTA
- **TCS** = do inglês, *Two Component Systems*, traduzido como Sistemas de Dois Componentes
- **TRIS** = tris (hidroximetil) aminometano
- **TRL-4** = receptores *toll-like 4*
- **TSB** = do inglês, *triptone soy broth*, traduzido como caldo triptona-soja
- **UFC/mL** = unidade formadora de colônia/mililitro
- **UPGMA** = do inglês, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*)
- **UTI's** = unidades de cuidado intensivo
- **v/v** = volume/volume
- **WGS** = do inglês *whole genome sequencing*, traduzido como sequenciamento do genoma completo
- **µL** = microlitro
- **°C** = graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1. (A)** Representação esquemática da organização da parede celular de bactérias Gram-negativas. **(B)** Detalhamento sobre as estruturas que compõe o LPS bacteriano..... **24**
- Figura 2.** Classificação de Ambler das β -lactamases, baseada no sítio ativo das diferentes enzimas..... **26**
- Figura 3.** Representação esquemática da ativação dos genes envolvidos com a modificação do LPS relacionados a resistência à polimixinas em BGN..... **33**
- Figura 4.** Incidência de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de enzimas carbapenemases e resistentes à polimixina B nas Américas..... **36**

CAPÍTULO II

- Figure 1.** Representation of the HEB locations from which CPRKp isolates were recovered showing ICU's were the main source..... **80**
- Figure 2.** Illustration depicting the prevalence of CPRKp in the different ICU's, showing that ICU Adult were the main source of them..... **80**
- Figure 3.** Representation of the biological specimen from which CPRKp isolates were recovered, showing that urine was the main source..... **81**
- Figure 4.** Relationship between the hospital sectors and the biological sample, showing that the ICUs and urine were the sites and biological material from which most isolates of CPRKp were recovered, respectively..... **82**

Figure 5. The resistance of CPRKp isolates to various broad-spectrum antimicrobials is depicted. (A) illustrates resistance to fluoroquinolones, with all isolates showing resistance. (B) showcases resistance to amikacin, with 62.3% of isolates demonstrating resistance. (C) displays resistance to gentamicin, with 72.3% of isolates exhibiting resistance. Lastly, (D) represents resistance to tigecycline, which was observed in 3.7% of the isolates..... **83**

Figure 6. Dendrogram showing the grouping of the 90 isolates of CPRKp in clusters, from A to E, according to their genetic similarity, after evaluation using the Dice coefficient. **85**

Figure 7. Relationship between the clusters and the *bla_{KPC}* gene, showing a high prevalence of this carbapenemase enzyme in the isolates studied. **87**

Figure 8. Minimum extent tree of allelic similarity generated from the cgMLST analysis of the 6 CPRKp isolates submitted to WGS compared to the strains collected from the MLST 2.0 database. (A) – ST 258, (B) – ST 340, (C) – ST 101 and (D) – ST 16..... **89**

Figure 9. Presentation of the data obtained for the isolates submitted to the WGS technique, highlighting the cgMLST, the presence of enzymes β -lactamases and carbapenemases, mutations in genes related to resistance to fluoroquinolones, aminoglycosides and tetracyclines, mutations in genes encoding expression to the AcrAB efflux pump and OmpK36 and OmpK37 porins and chromosomal mutations related to resistance to polymyxin B..... **91**

LISTA DE QUADROS E TABELAS

CAPÍTULO I

Quadro 1. Iniciadores utilizados para detecção dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos e à polimixina B.....	41
--	-----------

CAPÍTULO II

Table 1. Compiled data on isolates submitted to WGS, with emphasis on mutations in chromosomal genes related to resistance to polymyxin B.....	93
---	-----------

APÊNDICE

Tabela 1. Dados obtidos a partir das solicitações de cultura e seus respectivos antibiogramas, além do PFGE e da PCR.....	112
--	------------

RESUMO

Klebsiella pneumoniae é um patógeno frequentemente encontrado no ambiente hospitalar, associado a infecções de diversos sítios com elevadas taxas de morbimortalidade, sobretudo devido a sua capacidade de adquirir e expressar mecanismos de resistência contra praticamente todas as classes de antimicrobianos, incluindo a polimixina B. A caracterização dos mecanismos de resistência a esta droga é crucial para a definição de estratégias que evitem sua disseminação. O objetivo deste estudo foi identificar a possibilidade de expressão de mecanismos moleculares de resistência à polimixina B em isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e à polimixina B (CPRKp) provenientes de pacientes tratados em um hospital terciário localizado no município de Bauru, São Paulo, Brasil. Para tanto, 90 isolados previamente identificados fenotipicamente como CPRKp foram submetidos à *Polymerase Chain Reaction* (PCR), buscando pela presença do gene plasmidial *mcr-1* e, posteriormente, seis desses isolados, selecionados com base em sua clonalidade, foram submetidos ao *Whole Genome Sequencing* (WGS), visando identificar mutações em genes cromossomais associados à atividade dos *Two Component Systems* (TCS) PhoPQ e PmrAB, além de outros genes regulatórios, responsáveis por alterar a estrutura da fração lipídio A do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, conferindo resistência a esta droga. Entre os achados, observou-se que apenas um dos isolados sequenciados, pertencente ao cluster A / ST 258, apresentava mutação no gene cromossomal *pmrB*, diretamente relacionada à resistência à polimixina B. Além disso, dois isolados, incluindo o previamente mencionado, ambos pertencentes ao cluster A / ST 258, mostraram mutação pontual no gene *phoQ*, provavelmente associada à resistência a essa droga. Não foi detectada

a presença do gene plasmidial *mcr-1*. Entretanto, em todos os isolados sequenciados foram encontradas mutações em genes que codificam a expressão da bomba de efluxo AcrAB. Assim, nas condições ensaiadas, nossos resultados demonstraram a presença de mutações cromossômicas nos isolados pertencentes ao cluster A / ST258, sendo que, para os isolados pertencentes aos demais clusters, a resistência à polimixina B deve estar associada a outros mecanismos adaptativos, como a hiperexpressão de bombas de efluxo ou de cápsula polissacarídica.

PALAVRAS-CHAVE: *Klebsiella pneumoniae*, resistência antimicrobiana, polimixina B.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is a pathogen commonly found in the hospital environment, associated with infections in various sites with high morbidity and mortality rates, mainly due to its ability to acquire and express resistance mechanisms against virtually all classes of antimicrobials, including polymyxin B. Characterizing resistance mechanisms to this drug is crucial for defining strategies to prevent its spread. The objective of this study was to identify the possibly resistance mechanisms to polymyxin B presented by carbapenems and polymyxin B resistant *Klebsiella pneumoniae* (CPRKp) isolates from patients treated at a tertiary hospital located in the municipality of Bauru, São Paulo, Brazil. For this purpose, 90 isolates previously identified phenotypically as CPRKp were subjected to Polymerase Chain Reaction (PCR), aiming to detect the presence of plasmid gene *mcr-1*. Subsequently, six of these isolates, selected based on their clonality, underwent Whole Genome Sequencing (WGS) to identify mutations in chromosomal genes associated with the activity of the Two Component Systems (TCS) *phoPQ* and *pmrAB*, as well as other regulatory genes, responsible for altering the structure of the lipid A fraction of bacterial lipopolysaccharide (LPS), conferring resistance to this drug. Among the findings, it was observed that only one of the sequenced isolates, belonging to cluster A/ST 258, had a mutation in the chromosomal gene *pmrB* directly related to polymyxin B resistance. Additionally, two isolates, including the previously mentioned one, both belonging to cluster A/ST 258, showed a point mutation in the *phoQ* gene, probably associated with resistance to this drug. The presence of plasmid gene *mcr-1* was not detected. However, in all sequenced isolates, mutations were found in genes encoding the expression of the AcrAB efflux pump. Thus, under the tested conditions, our results

demonstrated the presence of chromosomal mutations in isolates belonging to cluster A / ST 258. For isolates belonging to other clusters, resistance to polymyxin B must be associated with other adaptive mechanisms, such as the overexpression of efflux pumps or polysaccharide capsule.

KEYWORDS: *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial resistance, polymyxin B.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO¹

A resistência antimicrobiana (RAM) é definida como a capacidade de microorganismos de neutralizarem a ação de agentes antimicrobianos através de mecanismos inerentes ou adquiridos. O isolamento de bactérias resistentes a um vasto repertório de agentes antimicrobianos, devido à expressão de diversos mecanismos de resistência, tem crescido exponencialmente nos últimos anos, sendo considerado um importante problema de saúde pública mundial (1–5).

Klebsiella pneumoniae é um patógeno muito prevalente no ambiente hospitalar e está associado a infecções relacionadas a elevadas taxas de morbidade e mortalidade, sobretudo devido à sua capacidade de adquirir e expressar mecanismos de resistência contra praticamente todas as classes de antimicrobianos (6–10), de modo que cepas de *K. pneumoniae* multidroga-resistentes têm sido isoladas no Brasil e em todo o mundo (4). Assim, a compreensão dos mecanismos pelos quais esta bactéria desenvolve a resistência às mais diversas classes de antimicrobianos, de modo a evitar sua disseminação inter e intra-hospitalar, bem como propor alternativas terapêuticas efetivas, são necessidades cada vez mais urgentes.

1.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella spp. é um microrganismo pertencente à ordem Enterobacterales, família Enterobacteriaceae, de distribuição ubíqua, já que é amplamente encontrado colonizando o trato gastrointestinal e, em menor proporção, a nasofaringe de humanos e animais, além de ser encontrado no ambiente – solo, água, entre outros. De modo

¹ Para as citações, bem como para a elaboração das referências, utilizou-se as normas de Vancouver, conforme documento disponibilizado pela Biblioteca da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu: <https://www.btu.unesp.br/#!/sobre/biblioteca/acervos-fisico-e-digital/normas-tecnicas/>.

particular, a espécie *Klebsiella pneumoniae* destaca-se como um patógeno associado a infecções de diversos sítios, seja de origem comunitária ou hospitalar (6,8,11–18), inclusive sendo incluído pela *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) no grupo de patógenos ESKAPE, um acrônimo que inclui bactérias capazes de causar infecções que ameaçam a vida, sobretudo em pacientes criticamente doentes e indivíduos imunocomprometidos, junto de *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (7,19).

K. pneumoniae é classificada como um micro-organismo Gram-negativo, uma vez que possui uma membrana externa na estrutura da parede celular, cujas principais funções estão relacionadas com a manutenção da estrutura bacteriana e com a regulação da permeabilidade a moléculas de alto peso molecular e hidrofóbicas (20–22). Esta membrana é dividida em duas camadas: a monocamada interna, que se relaciona intimamente com a parede celular, composta por fosfolipídeos, e a monocamada externa, onde é encontrado o lipopolissacarídeo (LPS). A membrana externa se mantém estável através de ligações de cátions divalentes, como magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}), entre os grupos fosfato do LPS, bem como por interações hidrofóbicas entre o LPS e proteínas (20–23).

O LPS é composto por três regiões: a fração lipídio A, em sua extremidade mais interna, o core de oligossacarídeo em sua porção central, e o antígeno O em sua extremidade mais externa. A fração lipídio A é composta por um esqueleto dissacarídico glicosaminafosforilado ligado a ácidos graxos, o que torna sua estrutura carregada negativamente, e ancora o LPS à superfície da monocamada interna; trata-se da endotoxina bacteriana, que promove a ativação dos receptores *toll-like 4* (TRL4), expressos principalmente em células fagocíticas, desencadeando resposta

inflamatória exacerbada. O *core* de oligossacarídeo é uma pequena porção central do LPS que, assim como a fração lipídio A, tem sua estrutura altamente conservada e desempenha papel fundamental nas funções de barreira da membrana externa bacteriana. A porção antígeno O é a mais externa do LPS e atua na fuga do ataque do sistema imunológico do hospedeiro. Dessa forma, essa porção é menos conservada do que a fração lipídio A e o *core* de oligossacarídeo e define as propriedades da superfície celular em espécies que não apresentam cápsula, uma vez que microrganismos que apresentam cápsula podem não apresentar o *core* de oligossacarídeo em seu LPS ou este não estar aparente na superfície celular (20–23).

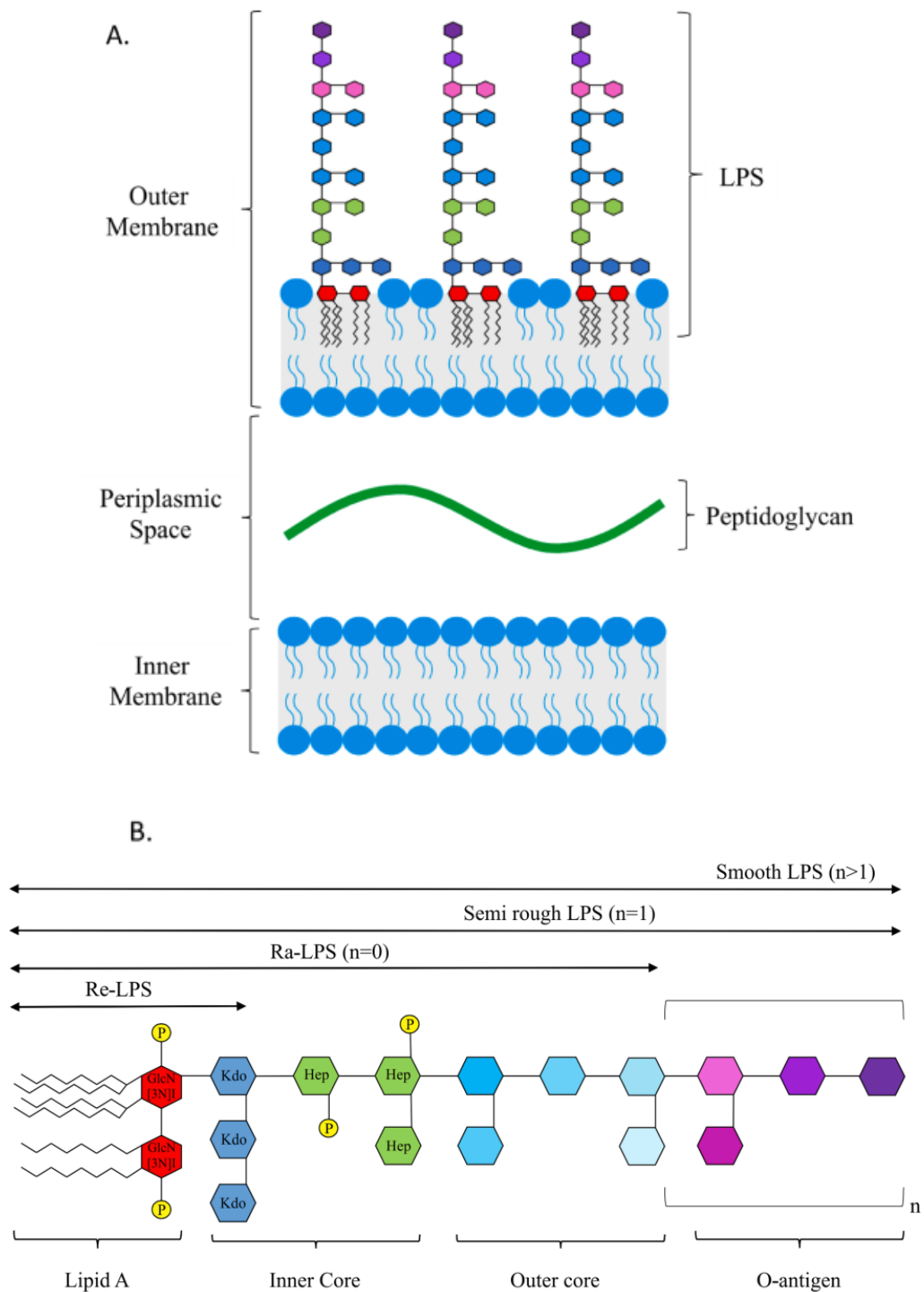


Figura 1. (A) Representação esquemática da organização da parede celular de bactérias Gram-negativas. **(B)** Detalhamento sobre as estruturas que compõe o LPS bacteriano. Adaptado de: (22).

1.2. Resistência aos carbapenêmicos

A produção e disseminação de enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e de β -lactamases do tipo AmpC foram os principais mecanismos de resistência apresentados pelas várias espécies da família Enterobacteriaceae, incluindo *K. pneumoniae*, relacionados com a resistência aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos até a metade dos anos 90, sendo raros os relatos de resistência aos carbapenêmicos (24). Com isso, o uso de cefalosporinas de amplo espectro para o tratamento empírico de infecções causadas por essas bactérias em pacientes hospitalizados ficou comprometido e o emprego de outros antimicrobianos tornou-se necessário, entre eles, os carbapenêmicos (25,26).

O aumento na utilização dos carbapenêmicos como importante alternativa terapêutica resultou no surgimento de cepas resistentes a esses fármacos (24–27); entre elas, os membros da família Enterobacteriaceae ganham relevância, uma vez que são responsáveis por surtos em unidades de saúde em várias partes do mundo e, em algumas localidades, já têm se tornado endêmicas, inclusive no Brasil (28–31).

Embora estáveis à maioria das β -lactamases produzidas pelas bactérias da família Enterobacteriaceae, os relatos de cepas resistentes aos carbapenêmicos têm aumentado significativamente nos últimos anos (32). A resistência aos carbapenêmicos pode ocorrer devido à combinação de vários mecanismos, como modificações na permeabilidade da membrana externa, devido à perda de porinas e/ou pela superexpressão de bombas de efluxo, associadas à hiperprodução de enzimas β -lactamases do tipo ESBL ou AmpC (33–36), ou ainda pela produção de enzimas β -lactamases específicas, capazes de hidrolisar os carbapenêmicos, genericamente conhecidas como carbapenemases (24,26,32,37). Essas enzimas representam a família mais versátil das β -lactamases, possuindo amplo espectro de atividade, que compreende

quase todos os antimicrobianos β -lactâmicos e são classificadas de acordo com seus requerimentos funcionais, bem como pela estrutura de seu sítio ativo, em serino- β -lactamases, pertencentes às classes A e D de Ambler, e em metalo- β -lactamases (MBL's), pertencentes à classe B de Ambler (25,32,38–40).

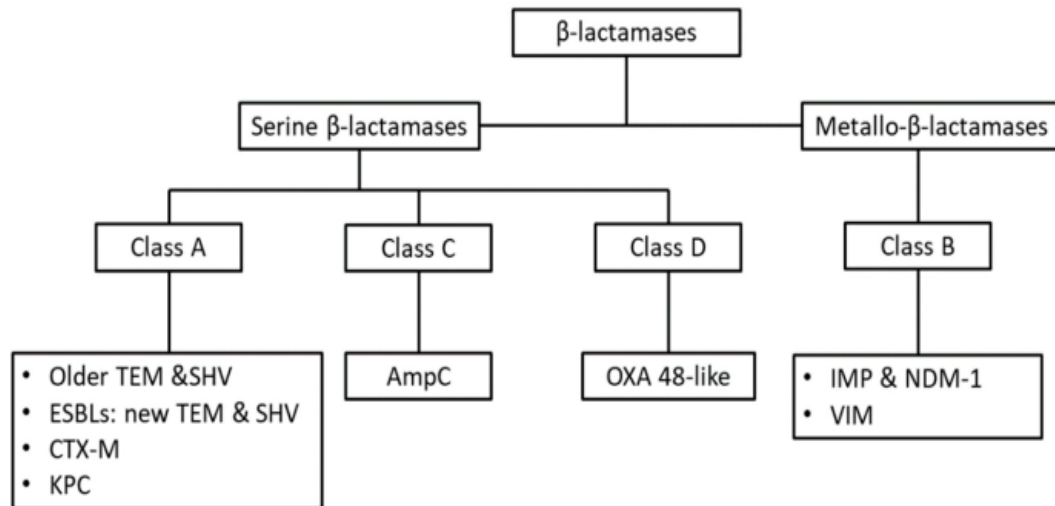


Figura 2. Classificação de Ambler das β -lactamases, baseada no sítio ativo e nos requerimentos funcionais das diferentes enzimas. Adaptado de: (41).

Os genes que codificam as enzimas carbapenemases são, geralmente, carregados por elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos e transposons, que podem abrigar outros genes, responsáveis por conferir resistência a outras classes de antimicrobianos. Estes elementos são transferíveis e podem ser adquiridos facilmente por micro-organismos de outros gêneros, conferindo a eles o perfil de multidroga-resistência, desta forma, reduzindo drasticamente as opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por cepas que expressam carbapenemases (42–45).

A determinação dos diferentes *sequence typings* (ST's) de *K. pneumoniae*, a partir da análise de dados gerados pela técnica *Multilocus Sequence Typing* (MLST), permite não apenas a análise de sua disseminação ao redor do mundo, mas também a avaliação da disseminação de diversos plasmídeos de resistência, como aqueles que

carreiam genes que codificam a produção de carbapenemases, já que são muito relacionados a alguns ST's específicos e com os grupos de incompatibilidade que estes abrigam (46–49).

As serino- β -lactamases da classe A de Ambler têm sido as carbapenemases mais frequentemente reportadas em isolados clínicos desde seu primeiro relato. Essas enzimas, que possuem a característica de serem induzíveis, possuem a habilidade de hidrolisar uma ampla variedade de β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (26,29,38).

A principal família de carbapenemases da classe A de Ambler é a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), cujo termo está associado à espécie bacteriana onde a enzima foi isolada e caracterizada pela primeira vez; porém, essa denominação é utilizada para descrever a presença da enzima independentemente da espécie, considerando que a mesma já foi identificada em grande parte dos membros da família Enterobacteriaceae (26,29,38).

A enzima KPC foi primeiramente isolada e caracterizada nos Estados Unidos, em uma cepa de *K. pneumoniae*, e foi identificada como KPC-1 (50). A partir deste relato, seguiram-se várias publicações de outra variante, a KPC-2, que diferia da KPC-1 em um aminoácido, identificada em 1998 em pacientes hospitalizados nos Estados Unidos; entretanto, sequenciamentos genéticos realizados posteriormente revelaram que os genes *bla*_{KPC-1} e *bla*_{KPC-2} possuíam 100% de similaridade, sendo as carbapenemases KPC-1 e KPC-2 idênticas (32,50). Desde a descoberta das enzimas KPC-1/KPC-2, várias novas variantes foram descritas, as quais diferem de KPC-1/KPC-2 pela substituição de, no máximo, dois aminoácidos (26,32).

O primeiro relato de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (CRE) produtoras de carbapenemases do tipo KPC no Brasil ocorreu em 2009, com a

identificação de quatro cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 em um hospital na cidade de Recife, Pernambuco (51). Entretanto, as primeiras evidências de enterobactérias produtoras de carbapenemases (CPE) do tipo KPC no Brasil são de isolados recuperados de 2005 (52). Desde então, outros relatos de isolados de enterobactérias produtoras de KPC têm sido descritos, de modo que as variantes KPC-2 e KPC-3 são consideradas endêmicas no país, o que representa um grande problema de saúde pública devido a escassez de alternativas terapêuticas disponíveis (27–30,32,53–55).

As serino- β -lactamases da classe D de Ambler são principalmente identificadas entre isolados de *Acinetobacter spp*; entretanto, as oxacilinases do tipo OXA-48 têm sido identificadas em espécies da família Enterobacteriaceae. Inicialmente isolada em cepa de *K. pneumoniae* na Turquia, e posteriormente em países da Europa e norte da África, a enzima OXA-48, codificada pelo gene plasmidial *bla*_{OXA-48}, guarda menos de 50% de similaridade em relação às demais enzimas do tipo OXA, e tem se disseminado por todo o mundo, conferindo resistência de baixo nível contra os carbapenêmicos, mas não às cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos, embora os isolados produtores de OXA-48 geralmente produzam outras enzimas responsáveis pela resistência aos β -lactâmicos, tais como ESBL (26,56).

As enzimas OXA-48-like, também codificadas por plasmídeos, são muito semelhantes às enzimas OXA-48, diferindo entre si em poucos aminoácidos (57). A enzima OXA-370, por exemplo, que difere da enzima OXA-48 em apenas um aminoácido, foi isolada no Brasil, inicialmente, em 2013, no Rio Grande do Sul (58) e, posteriormente, em 2015, no Rio de Janeiro (59).

Entre as carbapenemases da classe B de Ambler, as MBL's, tem ganhado

destaque a *New Delhi* metalo- β -lactamase (NDM-1), devido à sua rápida e ampla distribuição mundial após sua identificação inicial, em uma cepa de *K. pneumoniae* isolada de um paciente sueco de origem indiana, em 2009 (60). Desde então, os plasmídeos que carregam o gene *bla*_{NDM-1} têm sido encontrados em vários membros da família Enterobacteriaceae, estando relacionados com a resistência de alto nível a quase todos os antimicrobianos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos (26,61,62).

O primeiro relato de enterobactéria produtora de NDM-1 no Brasil ocorreu em 2013, no Rio Grande do Sul, em cepa de *Providencia rettgeri* (63), enquanto que a primeira identificação em cepa de *K. pneumoniae* isolada de amostra clínica no Brasil ocorreu em 2016, no interior do estado de São Paulo (64).

As infecções causadas por CPE, comumente resistentes à maioria das classes de antimicrobianos disponíveis, têm se tornado cada vez mais comuns e de difícil tratamento, sendo consideradas preditores independentes de mortalidade (41,46,48,65).

1.3. Resistência às polimixinas

A resistência às polimixinas tem sido crescentemente relatada em todo o mundo, especialmente em regiões com elevada prevalência de produção de enzimas carbapenemases, onde, conseqüentemente, seu uso é maior. Isto tem gerado um importante problema de saúde pública, já que as potenciais opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por CPE são bastante escassas e, muitas vezes, onerosas, estando indisponíveis em muitos hospitais (66–73).

Uma vez que são antimicrobianos anfipáticos, as polimixinas atuam como

detergentes catiônicos ao perturbar a estrutura da membrana citoplasmática bacteriana. A associação inicial entre as polimixinas e a membrana externa bacteriana ocorre através de interações eletrostáticas entre o fármaco, carregado positivamente, e a fração lipídio A das moléculas de LPS, carregada negativamente, levando a um desarranjo na membrana celular; além disso, ocorre o deslocamento das pontes formadas por cátions divalentes (Mg^{2+} e Ca^{2+}) que normalmente atuam estabilizando as moléculas de LPS. As cadeias laterais de ácidos graxos também interagem com o LPS, contribuindo para a complexação entre as polimixinas e a membrana externa. Como resultado desse processo, ocorre um aumento na permeabilidade da membrana bacteriana, induzindo sua ruptura, com extravasamento dos componentes citoplasmáticos e, conseqüentemente, morte celular (74–78).

Os bacilos Gram-negativos (BGN's), como *K. pneumoniae*, utilizam-se de vários mecanismos para se proteger de estímulos ambientais adversos, incluindo a exposição à antimicrobianos peptídicos catiônicos, como as polimixinas. Dentre eles, está a modificação na estrutura do LPS bacteriano, com alterações na carga elétrica da superfície da célula bacteriana e conseqüente redução na afinidade do antimicrobiano pela membrana externa. Tais modificações na estrutura do LPS ocorrem através da adição de 4-amino-4-deoxi-L-arabinose (L-Ara4N) ou fosfoetanolamina (pEtN) à fração lipídio A do LPS (71,79–85).

A regulação gênica do processo de alteração na estrutura do LPS é realizada por *Two Component Systems* (TCS). Os TCS são sistemas globais de regulação gênica, utilizados por várias espécies bacterianas para a regulação da expressão de diferentes fatores de resistência e de virulência. Eles são constituídos por uma proteína sensor de histidina-quinase, que capta estímulos ambientais ou é ativada por mutações, sofrendo uma reação de autofosforilação, ativando, por

consequente, uma proteína citoplasmática através de uma reação de transfosforilação. A proteína citoplasmática, então, promove a ativação ou a repressão dos genes-alvo, desencadeando a resistência às polimixinas (86–90).

Estudos têm mostrado que os TCS PhoPQ e PmrAB estão envolvidos com o desenvolvimento da resistência às polimixinas em *K. pneumoniae*; estes TCS estão relacionados com a adição de L-Ara4N e/ou pEtN à fração lipídio A do LPS bacteriano (86–90).

O TCS PhoPQ é ativado devido a mutações nos genes *phoP* ou *phoQ*, em situações de baixas concentrações de Mg^{2+} e pH ácido (pH 5.5) ou na presença de peptídeos catiônicos. O sensor histidina-quinase PhoQ, uma proteína integral de membrana cujo domínio periplasmático está envolvido na detecção de sinais, quando ativado, ativa a proteína PhoP por fosforilação. Então, o PhoP ativa o operon *arnBCADTEF* direta ou indiretamente (86–90).

Outra via de modificação do LPS bacteriano se deve à ativação constitutiva do TCS PmrAB, que pode ser desencadeada por mutações nos genes *pmrA* ou *pmrB*, ou ainda devido a concentrações elevadas de ferro (Fe^{3+}) e pH ácido (pH 5.5). Sob estas condições, o sensor histidina-quinase ligado à membrana PmrB ativa a proteína reguladora PmrA, a qual promove o *up-regulation* do operon *arnBCADTEF* (86–91).

O operon *arnBCADTEF* (também chamado de *pmrF* ou operon *pmrHFIJKLM*), uma vez ativado, codifica enzimas responsáveis pela síntese e transferência de L-Ara4N ou pEtN à fração lipídio A do LPS bacteriano que, por sua vez, torna-se menos carregado negativamente, diminuindo sua afinidade às polimixinas, resultando na resistência bacteriana. A adição de L-Ara4N requer os produtos do gene *pmrE* e do operon *arnBCADTEF*, enquanto que a adição de pEtN é codificada pelo operon *pmrCAB* (86–90).

Recentemente, estudos revelaram que a inativação do gene *mgrB*, que codifica uma pequena proteína transmembrana que exerce *feedback* negativo sobre o sistema regulatório PhoPQ, também está envolvida em modificações no LPS bacteriano que levam à resistência às polimixinas em *K. pneumoniae*. Tem sido proposto que a proteína MgrB realiza este *feedback* por inibição da atividade quinase do sistema PhoPQ e/ou estimulando a atividade fosfatase, o que subsequentemente suprime a fosforilação deste sistema, levando a repressão dos genes regulados pelo sistema PhoPQ. Assim, a perturbação do gene *mgrB* em *K. pneumoniae* tem sido identificada como tendo um papel proeminente na resistência às polimixinas, uma vez que resulta em *up-regulation* no operon *arnBCADTEF*, o que leva à adição de L-Ara4N ao lipídio A. Este *up-regulation* no operon *arnBCADTEF* é atribuído ao PmrA fosforilado, o qual é ativado pela proteína PmrD, que por sua vez é ativada pela fosforilação do PhoP resultante da perturbação da proteína MgrB (92–94).

Assim, tem sido demonstrado que inativações insercionais por várias sequências de inserção, mutações pontuais e deleções no locus *mgrB* podem resultar na resistência às polimixinas. Estes achados mostram a ocorrência de muitos eventos mutacionais independentes e sugerem que a alteração genética do gene *mgrB* pode ocorrer com relativa alta frequência e sem maiores consequências para o *fitness* e virulência das cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase (92,93).

O TCS CrrAB, recentemente descrito em algumas cepas de *K. pneumoniae* e adquirido por transferência horizontal de genes, também está envolvido na resistência à polimixina B, já que mutações no gene *crrB*, que codifica a expressão da proteína-sensor histidina-quinase CrrB, aumentam a expressão do gene *crrC*; isto implica na expressão da proteína CrrC e, conseqüentemente, na ativação do operon *arnBCADTEF* via TCS PmrAB, o que aumenta a adição de L-Ara4N e pEtN ao lipídio

A. Além disso, estudos têm mostrado que o TCS CrrAB também regula PhoPQ e aumenta a expressão de bombas de efluxo (95–97).

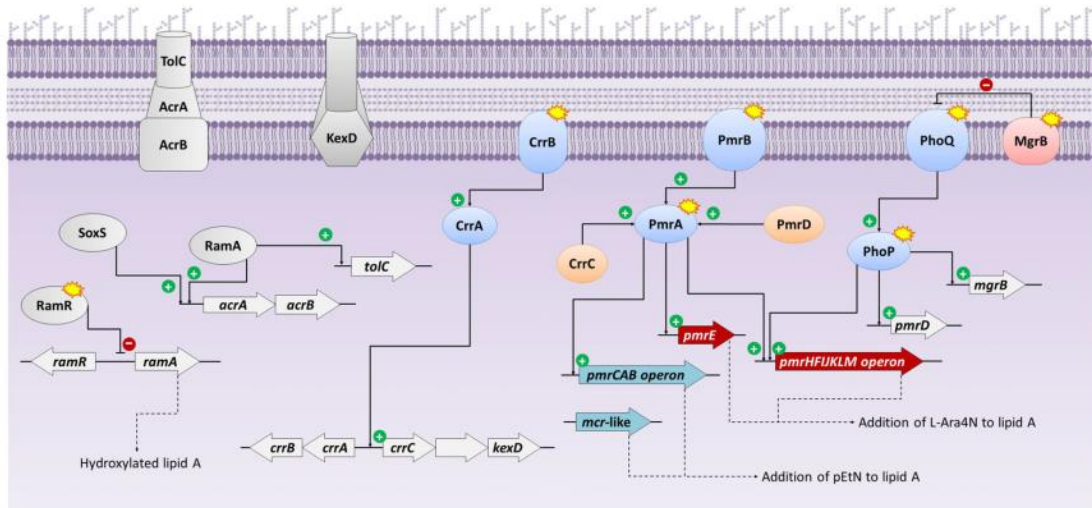


Figura 3. Representação esquemática da ativação dos genes envolvidos na modificação do LPS relacionados à resistência às polimixinas em BGN. Adaptado de: (97).

Outros mecanismos relacionados com o desenvolvimento de resistência às polimixinas em *K. pneumoniae* são a hiperprodução de cápsula polissacarídica e bombas de efluxo. A cápsula polissacarídica, uma vez produzida e presente na superfície bacteriana, é capaz de se ligar às polimixinas, reduzindo a quantidade de droga que alcança a superfície celular bacteriana, levando a um aumento na resistência às polimixinas; esse mecanismo é atribuído à interações eletrostáticas entre as polimixinas, catiônicas, e a cápsula polissacarídica, aniônica. Poucos estudos têm mostrado a contribuição de bombas de efluxo no desenvolvimento de resistência às polimixinas; entretanto, tem sido demonstrado que as bombas de efluxo AcrAB e KpnEF, presentes em cepas selvagens de *K. pneumoniae*, lançam as polimixinas para fora da célula bacteriana, em um processo dependente de energia (97,98).

Recentemente, foi demonstrado que não são apenas mutações cromossômicas que estão relacionadas ao desenvolvimento de resistência às

polimixinas em BGN, mas que esta resistência também pode ser mediada por enzimas carregadas por plasmídeos. Liu e colaboradores relataram a identificação do gene *mcr-1* em cepas de *Escherichia coli* isoladas de porcos, em 2015, na China (99). A proteína codificada pelo gene *mcr-1* é um membro da família de enzimas da classe fosfoetanolaminotransferases, cuja expressão resulta na adição de pEtN à fração lipídico A do LPS bacteriano. A partir de então, seguiram-se vários outros estudos a respeito da identificação do gene *mcr-1* em amostras de humanos, animais e mesmo ambientais (100–102). Após sua identificação inicial, o gene *mcr-1* foi encontrado em mais de 30 países, através dos 5 continentes (103–105).

Pouco tempo depois, pesquisadores identificaram um novo gene carregado por plasmídeos que conferia resistência às polimixinas em cepas de *E. coli* isoladas de suínos e bovinos que não possuíam o gene *mcr-1*, na Bélgica. Este novo gene, chamado de *mcr-2*, também faz parte da família de enzimas da classe das fosfoetanolaminotransferases e guarda 76,7% de similaridade de nucleotídeos com o gene *mcr-1* (106).

Relatos da identificação de novas variantes do gene *mcr*, *mcr-3* a *mcr-10*, têm se seguido na literatura e reforçam a possibilidade de transmissão da resistência às polimixinas por via horizontal, bem como sua capacidade de se disseminar globalmente (107,108).

Apesar da prevalência dos genes *mcr* ser bastante baixa entre humanos – menor que 1%, segundo estudos previamente realizados – sugerindo que sua disseminação através de alimentos, animais e do meio ambiente para humanos é mais baixa do que se imaginava inicialmente, existe grande preocupação com sua possível disseminação silenciosa, sobretudo em cepas já resistentes a outras classes de antimicrobianos, notadamente aquelas pertencentes à família Enterobacteriaceae

produtoras de carbapenemase (103,109–113). Tendo isto em vista, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) emitiu, em 2016, o comunicado nº 01/2016, que trata da importância e necessidade da detecção do gene *mcr-1* em isolados clínicos no Brasil (114). O primeiro relato de detecção deste gene em isolado clínico em território nacional ocorreu justamente em 2016, no Rio Grande do Norte (115).

É válido ressaltar, ainda, que a pressão seletiva gerada pelo uso crescente das polimixinas tem papel importante na seleção de cepas mutantes resistentes, que têm a capacidade de persistir e rapidamente se disseminar no ambiente hospitalar. Além disso, existem mecanismos de resistência às polimixinas ainda desconhecidos, para os quais estudos têm sido dirigidos, com o objetivo de compreender, ainda mais profundamente, a resistência a elas (116,117). Por fim, a resistência a estas drogas em isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases já tem sido amplamente encontrada no Brasil e em diversas regiões do mundo (97).



Figura 4. Incidência de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de enzimas carbapenemases e resistentes à polimixina B nas Américas. Adaptado de: (97).

1.4. Justificativa

O crescente impacto da resistência antimicrobiana é uma preocupação global. O Brasil apresenta, de modo geral, elevada prevalência de agentes patogênicos multidroga-resistentes entre aqueles principais responsáveis por diversos tipos de infecções, isolados de diferentes amostras clínicas, particularmente entre os BGN, dentre os quais, a *K. pneumoniae*; seus isolados apresentam a capacidade de

adquirir e expressar diversos mecanismos de resistência contra vários agentes antimicrobianos, o que tem se tornado uma realidade assustadora em muitos hospitais de todo o mundo. Vários estudos têm mostrado que o isolamento de espécimes de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e à polimixina B está associado a elevadas taxas de mortalidade, sendo, inclusive, preditores independentes de mortalidade (71,118–120).

Diante deste cenário, a identificação precoce e adequada da resistência aos carbapenêmicos e à polimixina B em *K. pneumoniae*, bem como sua caracterização molecular, se tornam relevantes, visando o conhecimento da epidemiologia local e permitindo a implementação de ações de controle que evitem sua disseminação. Esta perspectiva ganha ainda mais notoriedade dada a escassez de opções terapêuticas disponíveis para o tratamento das infecções causadas por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos, sendo a polimixina B e a colistina fármacos ainda muito prescritos e utilizados na prática clínica, mesmo diante de sua toxicidade inerente e do surgimento de novos agentes terapêuticos, ainda onerosos e com uso restrito a alguns sítios de infecção, estando indisponíveis em muitos hospitais ao redor do mundo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar a caracterização molecular de isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e à polimixina B (CPRKp), buscando identificar alvos gênicos envolvidos em mecanismos de resistência à polimixina B.

2.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar os isolados de CPRKp quanto à resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, por meio da pesquisa dos genes plasmidiais *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}*.
2. Caracterizar os isolados de CPRKp quanto à resistência à polimixina B, por meio da pesquisa do gene plasmidial *mcr-1*.
3. Determinar a clonalidade dos isolados de CPRKp.
4. Sequenciar o genoma de representantes dos diversos *clusters* identificados, buscando por mutações em genes cromossomais associadas à resistência à polimixina B.

3. MÉTODOS

3.1. Local e período do estudo. Os isolados de CPRKp selecionados para este estudo foram obtidos a partir das mais diversas amostras clínicas provenientes de pacientes tratados no Hospital Estadual Bauru (HEB), um hospital-escola terciário que atende pacientes provenientes da macrorregião de Bauru, Estado de São Paulo. Foram selecionados 90 isolados de CPRKp no período de abril de 2016 a novembro de 2018. Deve ser ressaltado que se tratam dos primeiros isolados com este perfil fenotípico recuperadas neste estabelecimento, de modo que todos os isolados com este perfil foram incluídos; porém, visando evitar a duplicidade entre as amostras, apenas um isolado por paciente foi incluído.

3.2. Seleção dos espécimes. Após a identificação e detecção da resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) e à polimixina B pela plataforma automatizada *Vitek® 2 Compact* (bioMérieux, Rio de Janeiro, Brasil), os isolados foram submetidos à técnica de microdiluição em caldo para polimixina B, técnica padrão-ouro para a determinação dos valores de concentração inibitória mínima (MIC) de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (121) e o *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST) (122), para confirmação da resistência a este antimicrobiano, empregando o kit comercial Policimbac (PROBAC DO BRASIL, São Paulo). Posteriormente, as amostras foram aliqüotadas em *tryptone soy broth* (TSB) acrescido de 10% de glicerol e armazenadas em freezer a -80°C até a realização dos testes moleculares.

3.3. Caracterização molecular dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos antimicrobianos carbapenêmicos e à polimixina B

3.3.1. Determinação da presença de genes plasmidiais relacionados à resistência aos carbapenêmicos e à polimixina B por técnica de PCR Multiplex.

A caracterização dos mecanismos de resistência dos isolados aos antimicrobianos carbapenêmicos foi realizada através de técnica de PCR Multiplex para detecção dos genes plasmidiais *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}*, e para a resistência à polimixina B, PCR Multiplex para o gene *mcr-1*.

Para a detecção dos genes que codificam enzimas carbapenemases *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}*, foi utilizado protocolo de PCR Multiplex descrito por Poirel e colaboradores (123). As reações foram preparadas em volume de 25 µL, com concentração final dos iniciadores a 0,2 µM cada (Quadro 1) e 1 µL de lisado bacteriano obtido por fervura de uma colônia. Os microtubos de 0,2 mL foram incubados em termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) sob as seguintes condições de ciclagem: um ciclo inicial de desnaturação (96 °C por 10 minutos), 36 ciclos de amplificação (96 °C por 30 segundos, 54 °C por 40 segundos, 72 °C por 50 segundos) e um ciclo de extensão final (72 °C por 5 minutos). Após, os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1,5% e submetidos a eletroforese. O gel foi, então, corado em brometo de etídio por 15 minutos, e fotografado em fotodocumentador sob luz ultravioleta (UV). De acordo com a comparação com os controles e com o marcador de peso molecular, os produtos amplificados tiveram o tamanho estimado para definir a positividade: *bla_{KPC}*, 798 pares de base (pb); *bla_{NDM}*, 621 pb; *bla_{OXA-48}*, 438 pb. Foram utilizados como controles as amostras *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (*bla_{KPC}*), *K. pneumoniae*

ATCC BAA-2146 (*bla_{NDM}*), *K. pneumoniae* NCTC 13443 (*bla_{OXA-48}*).

Para detecção do gene *mcr-1*, foi utilizado o protocolo de Liu e colaboradores (99). As reações foram realizadas com volume de 25 µL, com concentração final dos iniciadores (Quadro 1) a 0,25 µM e 1µL de lisado bacteriano obtido por fervura de uma colônia. Os microtubos foram, também, incubados em termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific), sob as condições de ciclagem: um ciclo inicial de desnaturação (95 °C por 10 minutos), 25 ciclos de amplificação (95 °C por 45 segundos, 60 °C por 45 segundos, 72 °C por 60 segundos) e um ciclo de extensão final (72 °C por 5 minutos). Após, os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1,5% e submetidos a eletroforese. O gel foi, então, corado em brometo de etídio por 15 minutos, e fotografado em fotodocumentador sob luz UV. O tamanho esperado do produto amplificado, de 309 pb, definiu a positividade. Como controle positivo, foi utilizado um isolado bacteriano previamente identificado e sequenciado.

Quadro 1. Iniciadores utilizados para detecção de genes plasmidiais associados a resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos e à polimixina B.

Alvo	Iniciador	Sequência
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-Fm	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG
	KPC-Rm	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG
<i>bla_{NDM}</i>	NDM-Fm	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC
	NDM-Rm	CGGAATGGCTCATCACGATC
<i>bla_{OXA-48}</i>	OXA-48-Fm	GCGTGGTTAAGGATGAACAC
	OXA-48-Rm	CATCAAGTTCAACCCAACCG
<i>mcr-1</i>	MCR-1-F	CGGTCAGTCCGTTTGTTC
	MCR-1-R	CTTGGTCGGTCTGTAGGG

3.3.2. Determinação do perfil eletroforético por técnica de PFGE. Todos os 90 isolados de CPRKp selecionados foram submetidos a técnica de PFGE, conforme protocolo preconizado por McDougal e colaboradores (124).

Para a extração de DNA, as amostras foram semeadas em ágar nutriente em tubo e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, foi realizada suspensão bacteriana, adicionando 1 mL de BSC (EDTA 0,5M pH 8.0, TRIS-HCl 1M pH 8.0) até que a suspensão alcançasse o padrão de turvação 3 da escala de MacFarland. Em seguida, 200 µL da suspensão foram transferidos para um microtubo contendo 5 µL de proteinase K (50 mg/µL – Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Alemanha). À suspensão, foram adicionados 200 µL de agarose 1%. A mistura foi rapidamente homogeneizada e distribuída nos moldes específicos, produzidos pelo fabricante do equipamento (BioRad, Hercules, EUA).

Após a solidificação dos blocos de agarose contendo DNA bacteriano, que ocorreu em geladeira por 5 minutos, os mesmos foram transferidos para tubos centrífuga contendo 2 mL de solução de lise (NaCl 1M, TRIS-HCl 6mM pH 7.6, EDTA 100mM pH 8.0, BRIJ-58 0,5%, desoxicolato 0,2%, sarcosina 0,5%, lisozima 1 mg/mL) e 5 µL de proteinase K (50 mg/ µL – Sigma-Aldrich®). Os tubos centrífuga foram incubados a 50 °C por 2 horas. Após a incubação, foram realizadas três lavagens com 10 mL de água milli Q a 50 °C por 15 minutos e uma vez com 7 mL de tampão TE a 50 °C por 15 minutos.

Um pedaço correspondente a um terço de um bloco de agarose foi transferido para um microtubo para a realização da digestão enzimática. Uma solução tampão da enzima XbaI foi preparada (90 µL de água esterilizada e 10 µL de solução tampão da enzima – Roche, São Paulo, Brasil), foi adicionada ao microtubo que continha um pedaço do bloco de agarose e em seguida, incubada a 4 °C por 30

minutos. Em seguida, os blocos de agarose foram tratados com a enzima de restrição XbaI (20U) (Roche) por 3 horas a 37 °C.

Para a corrida eletroforética, foi preparado um gel de agarose 1,0% (Lonza SeaKen® Gold, Basel, Suíça). A separação dos fragmentos ocorreu através de eletroforese em gel de campo pulsado, utilizando o sistema CHEF-DR III® (BioRad). As seguintes condições para a eletroforese foram utilizadas: tempo de pulso crescente de 0,5 a 35 segundos, por 15 horas a 6V/cm, na temperatura de 13 °C. Para padronização e para permitir a comparação dos géis gerados, foram utilizados padrões de peso molecular PFG Marker (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) em cada corrida.

Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5g/L), visualizados e fotografados sob luz ultravioleta utilizando-se ferramenta de fotodocumentação Lpix EX- Loccus Biotecnologia e fotografado utilizando o software Loccus LPix Image EX (versão 2.7, Loccus, Cotia, Brasil).

Para a determinação de *clusters* de similaridade foi utilizado o *software* BioNumerics® (*version 7.1; Applied Maths, Belgium*). A criação do dendrograma foi realizada pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) com tolerância da posição das bandas e a otimização ajustadas para 1,25 e 0,5% respectivamente. O coeficiente de similaridade de Dice $\geq 80\%$ foi escolhido para determinação dos *clusters*.

3.3.3. Sequenciamento completo do genoma bacteriano por WGS. Os isolados de CPRKp selecionados de acordo com os diferentes *clusters* identificados no PFGE foram submetidos ao sequenciamento do genoma completo por WGS para caracterização mais pormenorizada dos mecanismos de resistência por eles

apresentados.

Inicialmente, o DNA bacteriano foi extraído utilizando-se o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, USA), de acordo com as recomendações do fabricante, em busca de material genético de alta qualidade (apresentando banda única de alto peso molecular sem arraste de pequenos fragmentos ou RNA, em gel de agarose, com relação de pureza em A260/280 de aproximadamente 1.8 e A260/230 na faixa de 1.8 – 2.0, com quantidade mínima medida em *NanoDrop* de 150 ng/uL).

A biblioteca genômica foi construída utilizando-se de *beads* magnéticas com o kit DNA Prep para fragmentação do DNA, e a inserção dos adaptadores. O excesso de adaptadores foi retirado a partir de lavagens com *Tagment Wash Buffer* (Illumina®, San Diego, USA) em suporte magnético. Para formação de *clusters*, foi realizada uma PCR com os indexes i7 e i5 utilizando o kit Illumina DNA Prep (Illumina®) e respectivos indexes. Os produtos da PCR foram purificados usando *beads* magnéticas *Sample Purification Beads* (Illumina®) e passaram por processos de quantificação e normalização das bibliotecas a 8nM cada. As amostras foram unidas em um *pool* equimolar com uma concentração final de 16pM e adicionadas ao cartucho MiSeq (Illumina®) Kit v3 (*Paired end*) e em seguida analisadas na plataforma Illumina MiSeq (Illumina®). Ao fim da corrida foram obtidos *reads* com tamanho médio do fragmento de 75 pares de bases e cobertura esperada de 40 vezes.

Ao finalizar a corrida, parâmetros de qualidade (tamanho médio dos fragmentos, quantidade e tamanho de *reads* fora da faixa desejada, a presença de arraste e a cobertura em relação à referência utilizada) foram analisados para posterior montagem não baseada em referência (*de novo assembly*) do genoma, utilizando-se os *softwares* SPAdes v.3.12, *CLC Main Workbench* (Qiagen, Hilden,

Alemanha). Os parâmetros de qualidade da montagem foram avaliados utilizando-se o *software* Quast, para as estatísticas de N50, L50 e GC%. Obteve-se uma cobertura de, no mínimo, 30 vezes para cada base sequenciada. A identificação taxonômica molecular da espécie e subespécies de isolados de *K. pneumoniae* foi realizada utilizando dados brutos de sequenciamento (*short reads*) contra a *database* do *software* KRAKEN (v1.3.1).

Para extração dos dados gerados pelo sequenciamento completo de genoma, diferentes ferramentas públicas disponíveis *online* foram utilizadas:

- a) para identificação molecular das espécies: KmerFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/KmerFinder/>), SpeciesFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SpeciesFinder/>) e rMLST (https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_rmlst_seqdef_kiosk).
- b) para caracterização do resistoma: ResFinder (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder>), CARD (<https://card.mcmaster.ca>).
- c) para identificação da sequência tipo MLST: MLST 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>).
- d) para caracterização do plasmidoma: PlasmidFinder (<http://https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) e pMLST (<http://https://cge.cbs.dtu.dk/services/pMLST/>).
- e) para caracterização do viruloma: virulence database (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) e BacWGSTdb (http://bacdb.org/BacWGSTdb/analysis_single.php).
- f) para determinação do tipo capsular em *Klebsiella pneumoniae*: Kaptive Web (<http://kaptive.holtlab.net/>) e BacWGSTdp (<http://bigsub.pasteur.fr/>).

g) para análise filogenética baseada em polimorfismos de nucleotídeos únicos de alta qualidade CSI Phylogeny 1.4 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/>).

h) para visualização da árvore filogenética junto com os demais dados: plataforma Microreact (<https://microreact.org/showcase>).

Ao fim do processo, as sequências foram depositadas em bancos de dados de acesso público. A partir dos dados de sequenciamento, os plasmídeos tiveram todo seu conteúdo examinado, podendo elucidar sequências regulatórias e de mobilização dos genes de resistência neles inseridos.

3.4. Aspectos éticos da pesquisa. Por se tratar de um estudo experimental envolvendo amostras clínicas de pacientes tratados no HEB, o mesmo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu, com número do parecer 3.798.990, CAAE: 25887719.0.0000.5411.

REFERÊNCIAS

1. Pulingam T, Parumasivam T, Gazzali AM, Sulaiman AM, Chee JY, Lakshmanan M, et al. Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2022;170:106103. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106103>.
2. Nadeem SF, Gohar UF, Tahir SF, Mukhtar H, Pornpukdeewattana S, Nukthamna P, et al. Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria. *Crit Rev Microbiol* [Internet]. 2020;46(5):578–99. Available from: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1813687>.
3. Zhu Y, Huang WE, Yang Q. Clinical perspective of antimicrobial resistance in bacteria. *Infect Drug Resist*. 2022;15(March):735–46.
4. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399(10325):629–55.
5. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(27):E3574–81.
6. Dong N, Yang X, Chan EWC, Zhang R, Chen S. *Klebsiella* species: Taxonomy,

- hypervirulence and multidrug resistance. *eBioMedicine* [Internet]. 2022;79:103998. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103998>.
7. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of antimicrobial resistance in Pasteurellaceae. *PLoS One*. 2016;2016(1155):1–8.
 8. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(17):1–17.
 9. Hennequin C, Robin F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35(3):333–41.
 10. Karami-Zarandi M, Rahdar NA, Esmaeili H, Ranjbar R. *Klebsiella pneumoniae*: An update on antibiotic resistance mechanisms. *Future Microbiol*. 2023;18(1):65–81.
 11. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella pneumoniae* as nosocomial pathogens: epidemiology and resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(4):589–603.
 12. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):629–61.
 13. Piperaki ET, Syrogiannopoulos GA, Tzouvelekis LS, Daikos GL. *Klebsiella*

- pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. *Pediatr Infect Dis J*. 2017;36(10):1002–5.
14. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8(January):1–15.
 15. Navon-venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;(February):252–75.
 16. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 45:131–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.04.004>.
 17. Bengoechea A, Pessoa JS. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol Rev*. 2019;(September 2018):123–44.
 18. Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Spectr*. 2016;4(1).
 19. Venkateswaran P, Vasudevan S, David H, Shaktivel A, Shanmugam K, Neelakantan P, et al. Revisiting ESKAPE pathogens: virulence, resistance, and combating strategies focusing on quorum sensing. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13(June):1–30.

20. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(4):593–656.
21. Wang X, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res* [Internet]. 2010;49(2):97–107. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2009.06.002>.
22. Gorman A, Golovanov AP. Lipopolysaccharide structure and the phenomenon of low endotoxin recovery. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2022;180(May):289–307. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.10.006>.
23. Whitfield C, Stephen Trent M. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochem.* 2014;83(February):99–128.
24. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440–58.
25. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis.* 2011;53(1):60–7.
26. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol.* 2007;2(5):501–12.
27. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of carbapenem-resistant

- Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace. *J Infect Dis.* 2017;215(Suppl 1):S28–36.
28. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(2):1–37.
 29. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front Microbiol.* 2016;7(June):1–30.
 30. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis.* 2019;69(Suppl 7):S521–8.
 31. Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2014;20(7):1170–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4073868/pdf/12-1004.pdf>.
 32. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(9):785–96.
 33. Pulzova L, Navratilova L, Comor L. Alterations in outer membrane permeability favor drug-resistant phenotype of *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Drug Resist.*

- 2016;00(00):1–8.
34. Tamma PD, Doi Y, Bonomo RA, Johnson JK, Simner PJ. A primer on AmpC β -Lactamases: necessary knowledge for an increasingly multidrug-resistant world. *Clin Infect Dis*. 2019;69(8):1446-65.
 35. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Futur Microbiol* 9(9). 2016;9(September):1071–81.
 36. Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(8):2003–20.
 37. Karampatakis T, Tsergouli K, Behzadi P. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: virulence factors, molecular epidemiology and latest updates in treatment options. *Antibiotics*. 2023;12(234):1–23.
 38. Taggar G, Rheman MA, Boerlin P, Diarra MS. Molecular epidemiology of carbapenemases in Enterobacteriales from humans, animals, food and the environment. *Antibiotics*. 2020;9(10):1–22.
 39. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol*. 2014;22(12):686–96.
 40. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases.

- Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(3):969–76.
41. Kakoullis L, Papachristodoulou E, Chra P, Panos G. Mechanisms of antibiotic resistance in important antibiotic solutions. *Antibiotics*. 2021;1–25.
 42. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(6):2227–38.
 43. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4):1–61.
 44. Reyes JA, Melano R, Cárdenas PA, Trueba G. Mobile genetic elements associated with carbapenemase genes in South American Enterobacterales. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. 2020;24(3):231–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.03.002>.
 45. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(5):1121–37.
 46. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):5873–84.
 47. Fasciana T, Gentile B, Aquilina M, Ciammaruconi A, Mascarella C, Anselmo A,

- et al. Co-existence of virulence factors and antibiotic resistance in new *Klebsiella pneumoniae* clones emerging in south of Italy. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):1–10.
48. Yu X, Zhang W, Zhao Z, Ye C, Zhou S, Wu S, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates with focus on antimicrobial resistance. *BMC Genomics.* 2019;20(1):1–10.
49. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2020;18(6):344–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>.
50. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):1151–61.
51. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(1):333–4.
52. Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2702.
53. Zavascki AP, Zoccoli CM, Machado AB, Oliveira KR, Superti S V, Pilger DA, et

- al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting? *Int J Infect Dis*. 2010;14:e539–40.
54. Pereira PS, Felipe C, Araujo M De, Seki LM, Zahner V, Paula A, et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother*. 2013;11(October 2012):312–6.
55. Perez LRR, Dias CG. Emergence of infections due to a polymyxin B-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: what is the role of a previous colonization? *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2016;37(2):240–1.
56. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;559–62.
57. Magagnin CM, Campos JC, Rocha DA, Sampaio SCF, Rozales FP. Dissemination of *bla*_{OXA-370} is mediated by IncX plasmids and the Tn6435 transposon. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. [Internet] 2018. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-018-3356-x>.
58. Sampaio JLM, Ribeiro VB, Campos C, Rozales FP, Magagnin CM, Falci DR, et al. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D β -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(6):3566–7.

59. Pereira PS, Borghi M, Machado F, Martins A, Ribeiro C, Asensi MD, et al. Clonal Dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro , Brazil. *Antimicrob Infect Chemother*. 2015;59(8):4453–6.
60. Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, Nordmann P. Genetic features of *bla*_{NDM-1}-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(11):5403–7.
61. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(12):5046–54.
62. Camargo CH. Current status of NDM-producing Enterobacterales in Brazil: a narrative review. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2022;1339–44. Available from: <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00779-1>.
63. Carvalho-Assef APDA, Pereira S, Albano RM, Pavoni T, Chagas G, Falci DR, et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2013;2956–7.
64. Ferreira AM, Mondelli AL, Campos JGS De, Javaroni E, Gambarini PDS, Garcia DDO, et al. First report of a clinical isolate of New Delhi metallo- β -lactamase-

- producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. J Hosp Infect [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2016.05.019>.
65. Campos AC, Albiero J, Ecker AB, Kuroda CM, Meirelles LEF, Polato A, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase–producing *K. pneumoniae*: a systematic review. Am J Infect Control [Internet]. 2016;44(11):1374–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.03.022>.
66. Diep JK, Sharma R, Ellis-Grosse EJ, Abboud CS, Rao G. Evaluation of activity and emergence of resistance of polymyxin B and ZTI-01 (fosfomycin for injection) against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62(2):1815–7.
67. Bartolleti F, Seco BM, Santos CC, Felipe CB, Lemo ME, Alves TS, et al. Polymyxin B resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. Emerg Infect Dis. 2016;22(10):1849–51.
68. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Lancet Infect Dis. 2006;6(9):589–601.
69. Azam M, Gaiind R, Yadav G, Sharma A, Upmanyu K, Jain M, et al. Colistin resistance among multiple Sequence Types of *Klebsiella pneumoniae* is associated with diverse resistance mechanisms: a report from India. Front Microbiol. 2021;12(February):609840.

70. Stefaniuk EM, Tyski S. Colistin resistance in Enterobacterales strains – a current view. *Polish J Microbiol.* 2019;68(4):417–27.
71. Rojas LJ, Salim M, Cober E, Richter SS, Perez F, Salata RA, et al. Colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: laboratory detection and impact on mortality. *Clin Infect Dis.* 2017;64(6):711–8.
72. Rossi F, Girardello R, Cury AP, Di Gioia TSR, Almeida JN de, Duarte AJ da S. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. *Brazilian J Infect Dis [Internet].* 2017;21(1):98–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2016.09.011>.
73. Giamarellou H. Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. *Int J Antimicrob Agents [Internet].* 2016;48(6):614–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.025>.
74. Nang SC, Azad MAK, Velkov T, Tony Zhou Q, Li J. Rescuing the last-line polymyxins: achievements and challenges. *Pharmacol Rev.* 2021;73(2):679–728.
75. Velkov T, Thompson PE, Azad MAK, Roberts KD, Bergen PJ. History, chemistry and antibacterial spectrum. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1145:15–36.
76. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an ‘old’ class of antibiotics. *Futur Microbiol.*

- 2013;8(6):1–20.
77. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(3):449–65.
 78. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(2):557–96.
 79. Sampaio JLM, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2016;47:31–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.002>.
 80. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014;5(November):1–18.
 81. Moffatt JH, Harper M, Boyce JD. Mechanisms of polymyxin resistance. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1145:55–71.
 82. Dortet L, Bonnin R, Jousset A, Gauthier L, Naas T. Émergence de la résistance à la colistine chez les Entérobactéries: une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance! *J des Anti-Infectieux* [Internet]. 2016;18(4):139–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antinf.2016.09.003>.

83. Bakthavatchalam YD, Pragasam AK, Biswas I, Veeraraghavan B. Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: an update. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2018;12:124–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.09.011>.
84. Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2017;49(5):526–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.029>.
85. Moubareck CA. Polymyxins and bacterial membranes: a review of antibacterial activity and mechanisms of resistance. *Membranes (Basel)*. 2020;10(8):1–30.
86. Bhagirath AY, Li Y, Patidar R, Yerex K, Ma X, Kumar A, et al. Two component regulatory systems and antibiotic resistance in Gram-negative pathogens. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1–30.
87. Groisman EA, Kayser J, Soncini FC. Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg²⁺ environments. *J Bacteriol*. 1997;179(22):7040–5.
88. Gooderham WJ, Hancock REW. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev*. 2009;33(2):279–94.
89. Pitt ME, Elliot AG, Cao MD, Ganesamoorthy D, Karaikos I, Giamarellou H, et al. Multifactorial chromosomal variants regulate polymyxin resistance in

- extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Genomics*. 2018;4(3).
90. Mmatli M, Mbelle NM, Maningi NE, Osei Sekyere J. Emerging transcriptional and genomic mechanisms mediating carbapenem and polymyxin resistance in Enterobacteriaceae: a systematic review of current reports . *mSystems*. 2020;5(6):1–20.
 91. Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas MV, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(8):4762–6.
 92. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Türkoglu S, et al. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(1):75–80.
 93. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, Pilato V Di, Arena F, Conte V, et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(10):5696–703.
 94. Aires CAM, Pereira PS, Asensi MD, Carvalho-Assef APDA. *mgrB* mutations mediating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal surveillance swabs in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(11):6969–72.

95. Mcconville TH, Annavajhala MK, Giddins MJ, Macesic N, Herrera CM, Rozenberg FD, et al. CrrB positively regulates high-level polymyxin resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Cell Rep*. 2020;33(4):108313.
96. Jayol A, Nordmann P, Brink A, Villegas MV, Dubois V, Poirel L. High-level resistance to colistin mediated by various mutations in the *crrB* gene among carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(11):1–4.
97. Rodríguez-Santiago J, Cornejo-Juárez P, Silva-Sánchez J, Garza-Ramos U. Polymyxin resistance in Enterobacterales: overview and epidemiology in the Americas. *Int J Antimicrob Agents*. 2021;58(5).
98. Eicher T, Brandstätter L, Pos KM. Structural and functional aspects of the multidrug efflux pump AcrB. *Biol Chem*. 2009;390(8):693–9.
99. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016;16(2):161–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).
100. Quan J, Li X, Chen Y, Jiang Y, Zhou Z, Zhang H, et al. Prevalence of *mcr-1* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* recovered from bloodstream infections in China: a multicentre longitudinal study. *Lancet Infect Dis* [Internet].

- 2017;17(4):400–10. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30528-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30528-X).
101. Ovejero CM, Delgado-Blas JF, Calero-Caceres W, Muniesa M, Gonzalez-Zorn B. Spread of *mcr-1*-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(4):1050–3.
 102. Zurfluh K, Stephan R, Widmer A, Poirel L, Nordmann P, Nuesch HJ, et al. Screening for fecal carriage of MCR-producing Enterobacteriaceae in healthy humans and primary care patients. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6(1):7–10.
 103. Wang Y, Tian GB, Zhang R, Shen Y, Tyrrell JM, Huang X, et al. Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2017;17(4):390–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30527-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30527-8).
 104. Wang R, Van Dorp L, Shaw LP, Bradley P, Wang Q, Wang X, et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nat Commun* [Internet]. 2018;9(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-03205-z>.
 105. Sun J, Zhang H, Liu YH, Feng Y. Towards understanding MCR-like colistin resistance. *Trends Microbiol* [Internet]. 2018;26(9):794–808. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.02.006>.

106. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Malhotra-Kumar S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance*. 2016;21(27):6–11.
107. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance*. 2018;23(6):1–11.
108. Anyanwu MU, Jaja IF, Okpala COR, Njoga EO, Okafor NA, Oguttu JW. Mobile colistin resistance (*mcr*) gene-containing organisms in poultry sector in low- and middle-income countries: epidemiology, characteristics, and one health control strategies. *Antibiotics*. 2023;12(7):1117.
109. Quiroga C, Nastro M, Di Conza J. Current scenario of plasmid-mediated colistin resistance in Latin America. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2019;51(1):93–100. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.05.001>.
110. Aires AM, Conceição-Neto OC, Oliveira TRT, Dias CF, Montezzi LF, Picão RC, Albano RM, et al. Emergence of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017;61(7):e00317-17. Available from: <https://doi.org/10.1016/S1473-3099>.
111. Conceição-Neto OC, Aires CAM, Pereira NF, da Silva LHJ, Picão RC, Siqueira

- BN, et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;50(2):282–4.
112. Dalmolin TV, Castro L, Mayer FQ, Zavascki AP, Martins AF, de Lima-Morales D, et al. Co-occurrence of *mcr-1* and *bla_{KPC-2}* in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(8):2404–6.
113. Costa-Júnior SD, Ferreira YLA, Agreles MAA, Alves ÁEF, Melo de Oliveira MB, Cavalcanti IMF. Gram-negative bacilli carrying *mcr* gene in Brazil: a pathogen on the rise. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2023;54(2):1009–20. Available from: <https://doi.org/10.1007/s42770-023-00948-w>.
114. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Comunicado de risco nº 01/2016 - GVIMS/GGTES/ANVISA. Detecção do gene responsável pela resistência à polimixina mediada por plasmídeos (*mcr-1*) no Brasil. 2016;1–14.
115. Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello MA, Moura Q, Pérez-Chaparro PJ, Esposito F, et al. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 isolate from a human infection in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(10):6415–7.
116. Baron S, Hadjadj L, Rolain JM, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrob Agents* [Internet].

- 2016;48(6):583–91. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023>.
117. Gogry FA, Siddiqui MT, Sultan I, Haq QMR. Current update on intrinsic and acquired colistin resistance mechanisms in bacteria. *Front Med*. 2021;8(August):1–19.
118. Teo JQM, Chang CWT, Leck H, Tang CY, Lee SJY, Cai Y, et al. Risk factors and outcomes associated with the isolation of polymyxin B and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae spp.: a case–control study. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2019;53(5):657–62. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.03.011>.
119. Capone A, Giannella M, Fortini D, Giordano A, Meledandri M, Ballardini M, et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2013;19(1):E23–30. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12070>.
120. Darby EM, Trampari E, Siasat P, Gaya MS, Alav I, Webber MA, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat Rev Microbiol*. 2023;21(May):280–95.
121. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 33th ed. CLSI supplement M100S. Wayne PA;

CLSI:2023;1-402.

122. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). Tabela de pontos de corte para interpretação de CIM's e diâmetros de halos. BrCAST:2023;1–90.

123. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2011;70(1):119–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>.

124. CDC PulseNet. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. 2017;157(PNL05):1–16. Available from: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>.

CAPÍTULO II

**Polymyxin B resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*
isolated from a Brazilian tertiary hospital: Characterization of polymyxin B
resistance mechanisms**

Rafael Vecchi¹, Carlos Henrique Camargo², Felipe Onishi Nagamori², Lucas Porangaba¹,
James Venturini^{1,3}

¹ São Paulo State University (UNESP), Botucatu Medicine School, Infectious Diseases,
Dermatology, Imaging Diagnosis and Radiotherapy Department, 18618-687, Botucatu, SP,
Brazil.

² Adolfo Lutz Institute (IAL), Enteric Diseases and Special Pathogens Center, Bacteriology
Center, 01246-000, São Paulo, SP, Brazil.

³ Mato Grosso do Sul Federal University (UFMS), School of Medicine, 79070-900, Campo
Grande, MS, Brazil.

Corresponding author: Rafael Vecchi – e-mail: rafaelvecchi@unoeste.br

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is a pathogen commonly found in the hospital environment, associated with infections in various sites with high morbidity and mortality rates, mainly due to its ability to acquire and express resistance mechanisms against virtually all classes of antimicrobials, including polymyxin B. Characterizing resistance mechanisms to this drug is crucial for defining strategies to prevent its spread. The objective of this study was to identify the possibly resistance mechanisms to polymyxin B presented by carbapenems and polymyxin B resistant *Klebsiella pneumoniae* (CPRKp) isolates from patients treated at a tertiary hospital located in the municipality of Bauru, São Paulo, Brazil. For this purpose, 90 isolates previously identified phenotypically as CPRKp were subjected to Polymerase Chain Reaction (PCR), aiming to detect the presence of plasmid gene *mcr-1*. Subsequently, six of these isolates, selected based on their clonality, underwent Whole Genome Sequencing (WGS) to identify mutations in chromosomal genes associated with the activity of the Two Component Systems (TCS) *phoPQ* and *pmrAB*, as well as other regulatory genes, responsible for altering the structure of the lipid A fraction of bacterial lipopolysaccharide (LPS), conferring resistance to this drug. Among the findings, it was observed that only one of the sequenced isolates, belonging to cluster A/ST 258, had a mutation in the chromosomal gene *pmrB* directly related to polymyxin B resistance. Additionally, two isolates, including the previously mentioned one, both belonging to cluster A/ST 258, showed a point mutation in the *phoQ* gene, probably associated with resistance to this drug. The presence of plasmid gene *mcr-1* was not detected. However, in all sequenced isolates, mutations were found in genes encoding the expression of the AcrAB efflux pump. Thus, under the tested conditions, our results

demonstrated the presence of chromosomal mutations in isolates belonging to cluster A / ST 258. For isolates belonging to other clusters, resistance to polymyxin B must be associated with other adaptive mechanisms, such as the overexpression of efflux pumps or polysaccharide capsule.

KEYWORDS: *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial resistance, polymyxin B.

1. INTRODUCTION

Klebsiella pneumoniae is a Gram-negative microorganism very prevalent in the hospital settings, causing infections across various body sites associated with elevated rates of morbidity and mortality. The emergence of extensively drug-resistant strains, such as fluoroquinolones, aminoglycosides, carbapenems, and polymyxins has created a significant public health challenge, resulting in a shortage of viable alternatives for treating these infections (1-7).

Polymyxin B, an antibiotic currently used for resistant Gram-negative bacilli infections, is a positively charged cyclic cationic polypeptide antimicrobial. It interacts electrostatically with the lipid A fraction of the negatively charged bacterial lipopolysaccharide (LPS), promoting the displacement of the bridges formed by divalent ions (Mg^{2+} and Ca^{2+}), which acting to stabilize the LPS structure. Additionally, the side chains of polymyxin B feature a terminal fatty acid that interacts with LPS, enhancing the complexation between the drug and the outer membrane. The outcome of this interaction is the destruction of the bacterial outer membrane, leading to increased permeability, extravasation of the cytoplasmic content, membrane rupture, and ultimately, cellular death (8-11).

Polymyxin B resistance is mediated by chromosomal mechanisms influenced by environmental stimuli or mutations in genes associated with Two-Component Systems (TCS), including *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB*, *mgrB*, *crrB* and others. Additionally, enzymes carried by mobile genetic elements, such as *mcr-1*, play a role in resistance. In general, these mechanisms involve the insertion of molecules like 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) or phosphoethanolamine (pEtN) into the bacterial LPS lipid A fraction. This process reduces the number of negative charges,

leading to lower affinity for the drug (12-21).

Additional mechanisms have been associated with the emergence of polymyxin B resistance in *K. pneumoniae*, including polysaccharide capsule and efflux pumps overproduction. The polysaccharide capsule, once present on the bacterial surface, binds to polymyxins, reducing the amount of drug reaching the bacterial cell surface, resulting in an increasing resistance to polymyxins. Moreover, AcrAB and KpnEF efflux pumps, inherent in wild strains of *K. pneumoniae*, expel polymyxins from the bacterial cell through an energy-dependent process, contributing to resistance to this drug (12-21).

In this context, the early identification of polymyxin B resistance mechanisms in *K. pneumoniae* plays a crucial role in enhancing understanding of local epidemiology. This knowledge not only leads the selection of the most suitable empirical treatment but also allows the implementation of control measures to prevent further spread. The aim of this study is to elucidate the mechanisms involved in polymyxin B resistance in carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates (CPRKp) through molecular biology techniques.

2. METHODS

2.1. Selection of specimens

The CPRKp isolates selected for this study were obtained from a variety of clinical samples collected from patients treated at the State Hospital of Bauru (HEB), a tertiary teaching hospital that serves patients from the Bauru macroregion, State of São Paulo. Ninety CPRKp isolates were selected between April 2016 and November

2018. It is noteworthy that these are the first isolates with this phenotypic profile recovered at this institution, and all isolates with this profile were included. However, to avoid sample duplication, only one isolate per patient was included.

After identification and detection of resistance to carbapenem antimicrobials (imipenem, meropenem, and ertapenem) and polymyxin B using the automated Vitek® 2 Compact platform (bioMérieux, Rio de Janeiro, Brazil), the isolates underwent broth microdilution for polymyxin B, the gold standard technique for determining minimum inhibitory concentration (MIC) values as per the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (22). This was done to confirm resistance to polymyxin B, utilizing the commercial kit Policimbac (PROBAC DO BRASIL, São Paulo). Subsequently, the samples were aliquoted into tryptone soy broth (TSB) with 10% glycerol and stored in a freezer at -80°C until molecular testing was conducted.

2.2. Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR)

The characterization of resistance mechanisms of isolates to carbapenem antimicrobials was carried out through the Multiplex PCR technique for the detection of plasmid genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, and *bla_{OXA-48}*. For polymyxin B resistance, Multiplex PCR was employed for gene *mcr-1*.

To detect genes encoding carbapenemase enzymes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, and *bla_{OXA-48}*, the Multiplex PCR protocol described by Poirel and colleagues (23) was utilized. Reactions were prepared in a volume of 25 µL, with a final concentration of 0.2 µM for each primer utilized and 1 µL of bacterial lysate obtained by boiling a colony. The 0.2 mL microtubes were incubated in a Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) under the following cycling conditions: an initial denaturation cycle (96 °C for 10 minutes), 36 amplification cycles (96 °C for 30

seconds, 54 °C for 40 seconds, 72 °C for 50 seconds), and a final extension cycle (72 °C for 5 minutes). Subsequently, the amplified products were applied to a 1.5% agarose gel and subjected to electrophoresis. The gel was then stained with ethidium bromide for 15 minutes and photographed using a photodocumenter under ultraviolet (UV) light. Based on comparison with controls and the molecular weight marker, the amplified products were sized to determine positivity: *bla*_{KPC}, 798 base pairs (bp); *bla*_{NDM}, 621 bp; *bla*_{OXA-48}, 438 bp. *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (*bla*_{KPC}), *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 (*bla*_{NDM}), and *K. pneumoniae* NCTC 13443 (*bla*_{OXA-48}) were used as controls.

For the detection of *mcr-1* gene, the protocol by Liu and colleagues (24) was employed. Reactions were conducted with a volume of 25 µL, with a final concentration of 0.25 µM for the primers utilized and 1 µL of bacterial lysate obtained by boiling a colony. The microtubes were also incubated in a Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) under the cycling conditions: an initial denaturation cycle (95 °C for 10 minutes), 25 amplification cycles (95 °C for 45 seconds, 60 °C for 45 seconds, 72 °C for 60 seconds), and a final extension cycle (72 °C for 5 minutes). Subsequently, the amplified products were applied to a 1.5% agarose gel and subjected to electrophoresis. The gel was then stained with ethidium bromide for 15 minutes and photographed using a photodocumenter under UV light. Positivity was defined by the expected size of the amplified product, 309 bp. As a positive control, a bacterial isolate previously identified and sequenced was utilized.

2.3. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

All 90 selected CPRKp isolates underwent PFGE technique as per the protocol recommended by McDougal and colleagues (25).

For DNA extraction, the samples were streaked on nutrient agar in tubes and incubated at 37 °C for 24 hours. After incubation, a bacterial suspension was prepared by adding 1 mL of BSC (0.5M EDTA pH 8.0, 1M TRIS-HCl pH 8.0) until the suspension reached turbidity standard 3 on the MacFarland scale. Subsequently, 200 µL of the suspension were transferred to a microtube containing 5 µL of proteinase K (50 mg/µL – Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germany). To the suspension, 200 µL of 1% agarose were added. The mixture was quickly homogenized and distributed into specific molds provided by the equipment manufacturer (BioRad, Hercules, USA).

After the agarose blocks containing bacterial DNA solidified, which occurred in the refrigerator for 5 minutes, they were transferred to centrifuge tubes containing 2 mL of lysis solution (1M NaCl, 6mM TRIS-HCl pH 7.6, 100mM EDTA pH 8.0, 0.5% BRIJ-58, 0.2% deoxycholate, 0.5% sarcosine, 1 mg/mL lysozyme) and 5 µL of proteinase K (50 mg/µL – Sigma-Aldrich®). The centrifuge tubes were incubated at 50 °C for 2 hours. After incubation, three washes with 10 mL of milli Q water at 50 °C for 15 minutes and one wash with 7 mL of TE buffer at 50 °C for 15 minutes were performed.

A piece corresponding to one-third of an agarose block was transferred to a microtube for enzymatic digestion. A buffer solution of the XbaI enzyme was prepared (90 µL of sterilized water and 10 µL of enzyme buffer solution – Roche, São Paulo, Brazil), added to the microtube containing a piece of the agarose block, and then incubated at 4 °C for 30 minutes. Subsequently, the agarose blocks were treated with the XbaI restriction enzyme (20U) (Roche) for 3 hours at 37 °C.

For electrophoresis, a 1.0% agarose gel (Lonza SeaKen® Gold, Basel, Switzerland) was prepared. Fragment separation occurred through pulsed-field gel electrophoresis using the CHEF-DR III® system (BioRad). The following conditions for

electrophoresis were used: a rising pulse time from 0.5 to 35 seconds, for 15 hours at 6V/cm, at a temperature of 13 °C. For standardization and to allow gel comparison, PFG Marker (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) molecular weight standards were used in each run.

After electrophoresis, gels were stained with ethidium bromide (0.5g/L), visualized, and photographed under ultraviolet light using the Lpix EX photodocumentation tool from Locus Biotechnologia and photographed using the Locus LPix Image EX software (version 2.7, Locus, Cotia, Brazil).

For the determination of similarity clusters, BioNumerics® software (version 7.1; Applied Maths, Belgium) was used. The dendrogram was created by the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) method with band position tolerance and optimization set to 1.25 and 0.5%, respectively. A Dice similarity coefficient of $\geq 80\%$ was chosen for cluster determination.

2.4. Whole-Genome Sequencing (WGS)

The selected CPRKp isolates, chosen based on distinct clusters identified in PFGE, underwent Whole-Genome Sequencing (WGS) for a more detailed characterization of their resistance mechanisms.

Initially, bacterial DNA extraction utilized the Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison, USA) following the manufacturer's recommendations to obtain high-quality genetic material (displaying a single band of high molecular weight without trailing small fragments or RNA on agarose gel, with a purity ratio at A260/280 approximately 1.8, and A260/230 in the range of 1.8 to 2.0, and a minimum quantity of 150 ng/ μ L as measured by NanoDrop).

Genomic library construction involved the use of magnetic beads with the

DNA Prep kit for DNA fragmentation and adapter insertion. Excess adapters were removed through washes with Tagment Wash Buffer (Illumina®, San Diego, USA) on a magnetic support. For cluster formation, a PCR with i7 and i5 indices was performed using the Illumina DNA Prep kit (Illumina®) and their respective indices. PCR products were purified using Sample Purification Beads (Illumina®) and underwent quantification and library normalization to 8nM each. Samples were combined into an equimolar pool with a final concentration of 16pM and added to the MiSeq cartridge (Illumina®) Kit v3 (Paired end) and then analyzed on the Illumina MiSeq platform (Illumina®). After the run, reads with an average fragment size of 75 bp and an expected coverage of 40 times were obtained.

Post-run, quality parameters (average fragment size, quantity and size of reads outside the desired range, presence of trailing, and coverage compared to the reference used) were analyzed for subsequent reference-free assembly (de novo assembly) of the genome. This was accomplished using SPAdes v.3.12 and CLC Main Workbench (Qiagen, Hilden, Germany). Quality parameters of the assembly were evaluated using Quast software for N50, L50, and GC% statistics. A coverage of at least 30 times for each sequenced base was achieved.

Molecular taxonomic identification of the species and subspecies of *K. pneumoniae* isolates was performed using raw sequencing data (short reads) against the KRAKEN software database (v1.3.1).

For the extraction of data generated by whole-genome sequencing, various publicly available online tools were utilized. At the conclusion of the process, the sequences were deposited in publicly accessible databases. Utilizing the sequencing data, the plasmids underwent a comprehensive examination of their content, allowing for the elucidation of regulatory sequences and the mobilization of resistance genes

integrated within them.

2.5. Ethical aspects of research

As this is an experimental study involving clinical samples from patients treated at HEB, it was submitted and approved by the Research Ethics Committee of the Botucatu Medicine School, with approval number 3.798.990, CAAE: 25887719.0.0000.5411.

3. RESULTS

3.1. The main source of CPRKp is found in ICU settings and urine samples.

Out of the 90 CPRKp isolates studied came from patients treated at different HEB sectors; 46 (51.1%) of them were derived from patients treated in the Intensive Care Units (ICU's) of the referred hospital, 38 (42.2%) of the samples were obtained from patients admitted into various hospital wards, while 6 (6.7%) originated from outpatients.

Figure 1 displays the various locations within HEB from which CPRKp isolates were recovered.

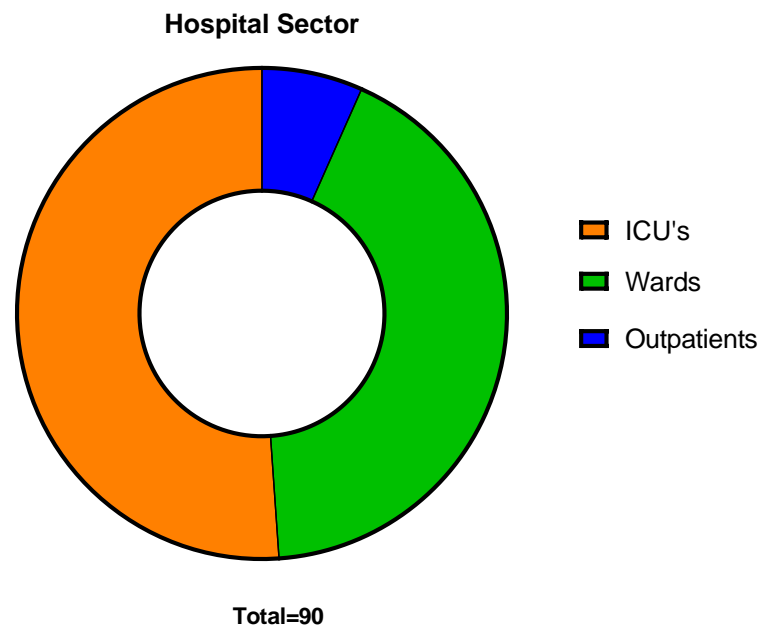


Figure 1 – Representation of the HEB locations from which CPRKp isolates were recovered showing ICU's were the main source.

Figure 2 illustrates the distinct ICU's comprising HEB and the prevalence of CPRKp isolation in each of them. About 46 isolates recovered from the ICU's, 35 (76.1%) were from an Adult ICU, 7 (15.2%) were from a Burns specialty ICU, while 3 (6.5%) were from a Coronary specialty ICU and 1 (2.2%) were from a Pediatric ICU.

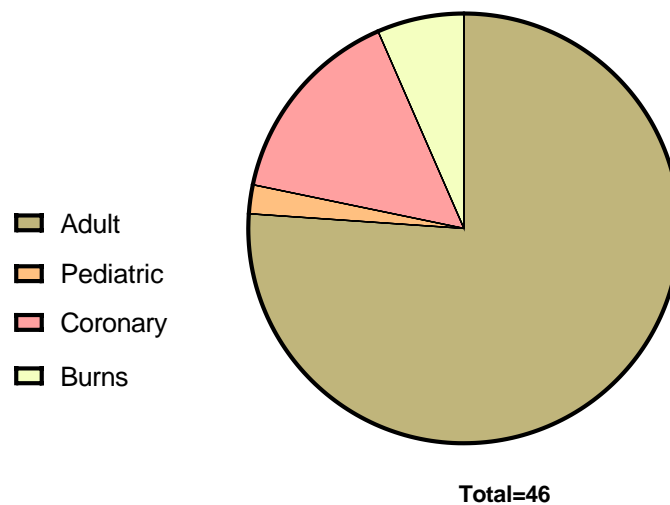


Figure 2 – Illustration depicting the prevalence of CPRKp in the different ICU's, showing that ICU Adult were the main source of them.

Urine emerged as the main biological specimen from which isolates were recovered, contributing with 51 (56.7%) of the total. Others biological specimens yielding isolates included tracheal secretion (15 samples, 16.7% of the total), blood (9 samples, 10%), catheter tips (7 samples, 7.8%), general secretions (5 samples, 5.5%), cavitary liquids (2 samples, 2.2%) and general fragments (1 sample, 1.1%) (Figure 3).

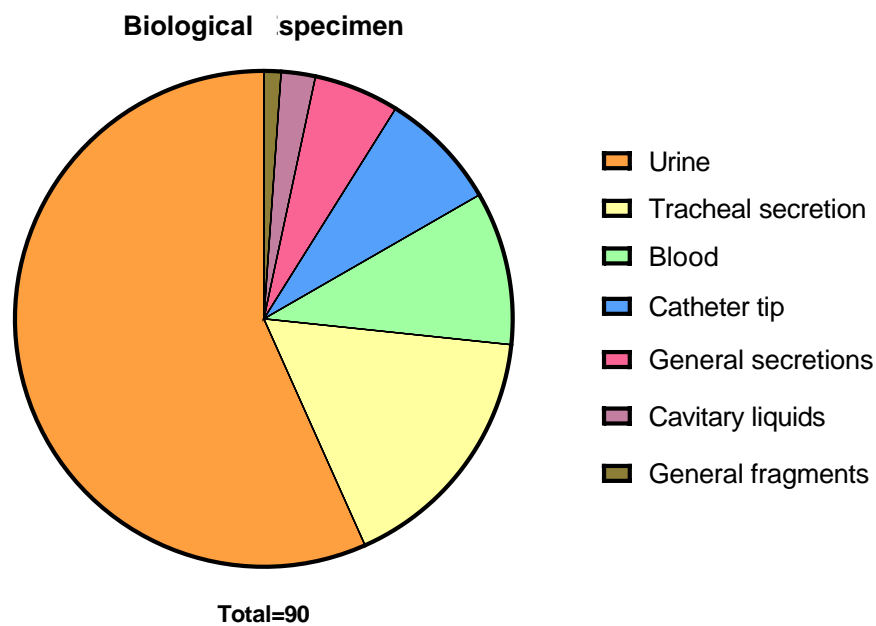


Figure 3 – Representation of the biological specimen from which CPRKp isolates were recovered, showing that urine was the main source.

Figure 4 illustrates the correlation between hospital isolation sector and biological specimen from which the isolates were obtained.

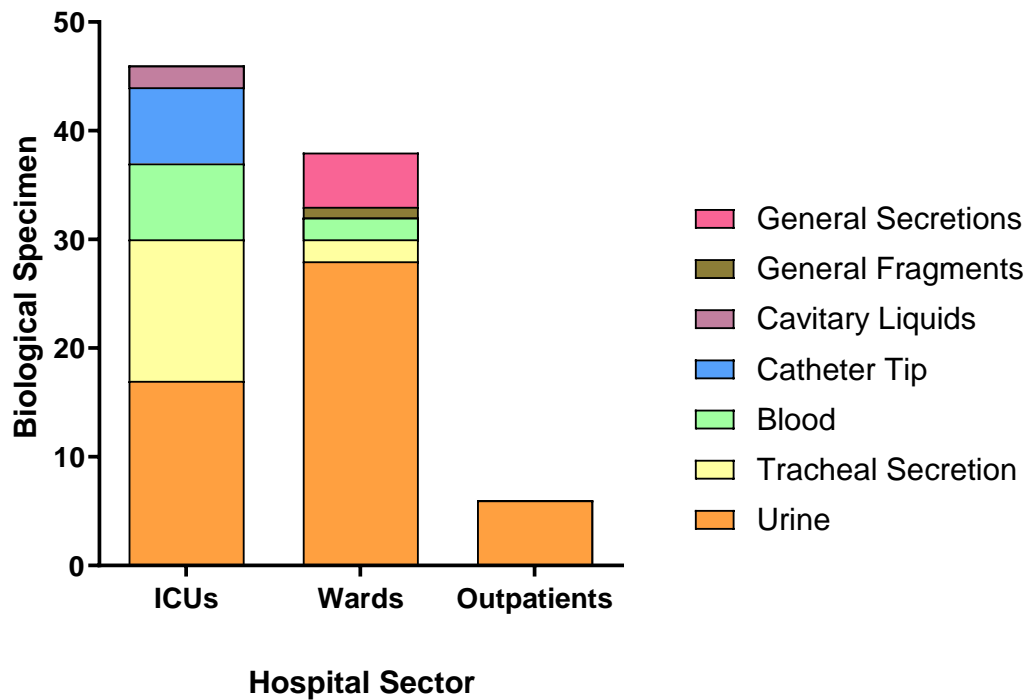


Figure 4 – Relationship between the hospital sectors and the biological sample, showing that the ICUs and urine were the sites and biological material from which most isolates of CPRKp were recovered, respectively.

Another important characteristic of the studied isolates is their resistance to other broad-spectrum antimicrobials frequently employed as alternatives for treating multi-site infections caused by CPRKp. Out of 90 samples, all were been resistant to fluoroquinolones. Moreover, 56 (62.3%) exhibited resistance to amikacin, 67 (72.3%) to gentamicin, and a smaller proportion, 3 isolates (3.7%), demonstrated resistance to tigecycline (Figure 5).

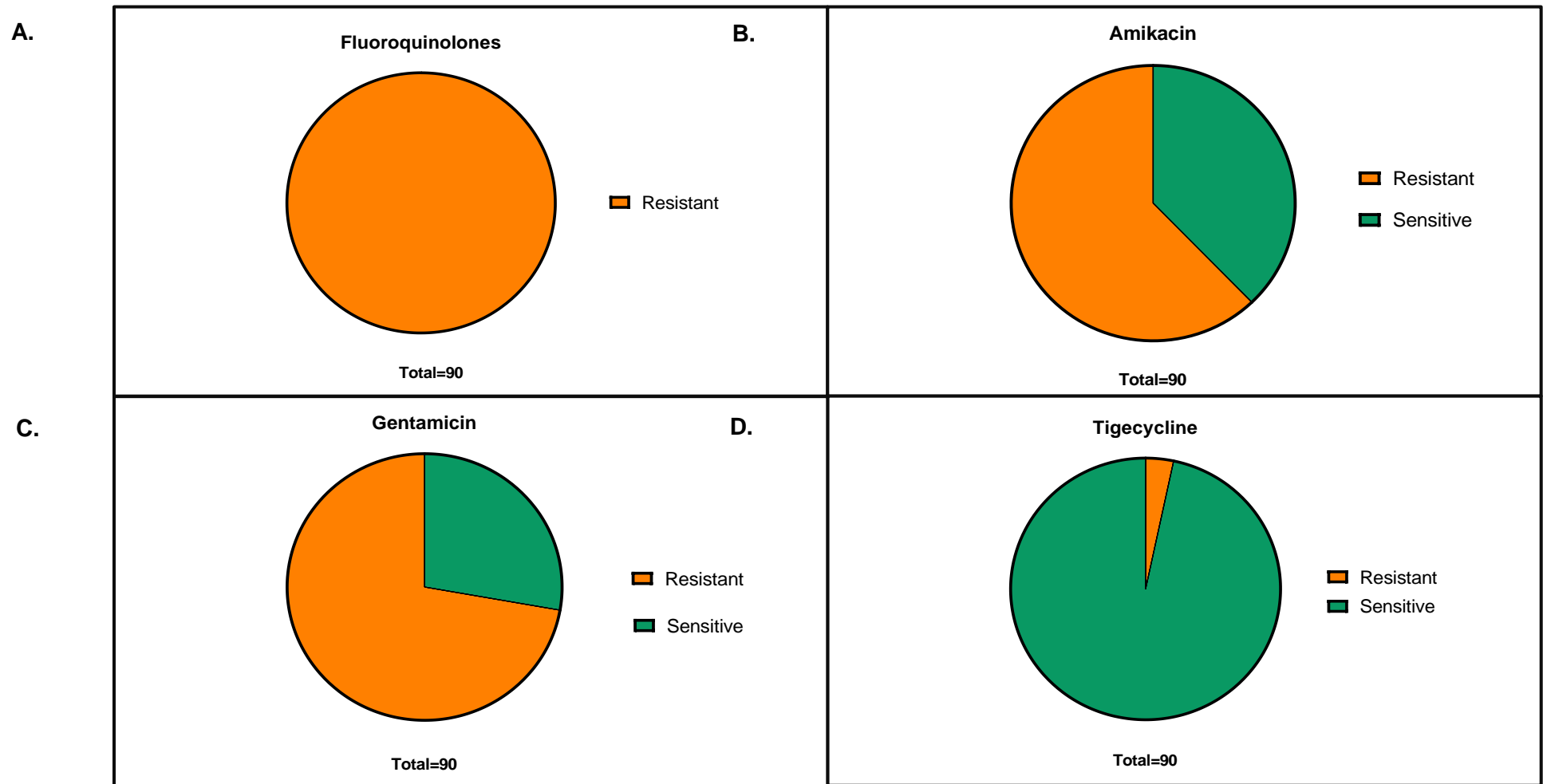


Figure 5 – The resistance of CPRKp isolates to various broad-spectrum antimicrobials is depicted. (A) illustrates resistance to fluoroquinolones, with all isolates showing resistance. (B) showcases resistance to amikacin, with 62.3% of isolates demonstrating resistance. (C) displays resistance to gentamicin, with 72.3% of isolates exhibiting resistance. Lastly, (D) represents resistance to tigecycline, which was observed in 3.7% of the isolates.

3.2. There is a dominant clone in the hospital: cluster A, and KPC is the main carbapenem resistance

The 90 CPRKp isolates underwent Multiplex PCR analysis to identify plasmid genes associated with carbapenems and polymyxin B resistance. The investigation focused on detecting *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* and *bla_{OXA-48}* genes related to carbapenem resistance, as well as *mcr-1* gene, associated to polymyxin B resistance.

Results revealed that 83 (92.2%) of the CPRKp samples harbored the *bla_{KPC}* plasmid gene. None of the other investigated plasmid genes were found.

Subsequent performing the PFGE technique identified six clusters labeled A, B, C, D, E and F. Cluster A emerged as the most prevalent, encompassing 64 (71.1%) of the isolates were covered by it. The second most prevalent cluster was E, covering 15 (16.7%) isolates. Cluster B also demonstrated an important prevalence, accounting for 8 (8.9%) of the isolates. Clusters C, D and F consisted of only 1 isolate each (1.1% for each cluster). The dendrogram in Figure 6 illustrates the similarity clusters based on the Dice similarity coefficient ($\geq 80\%$).

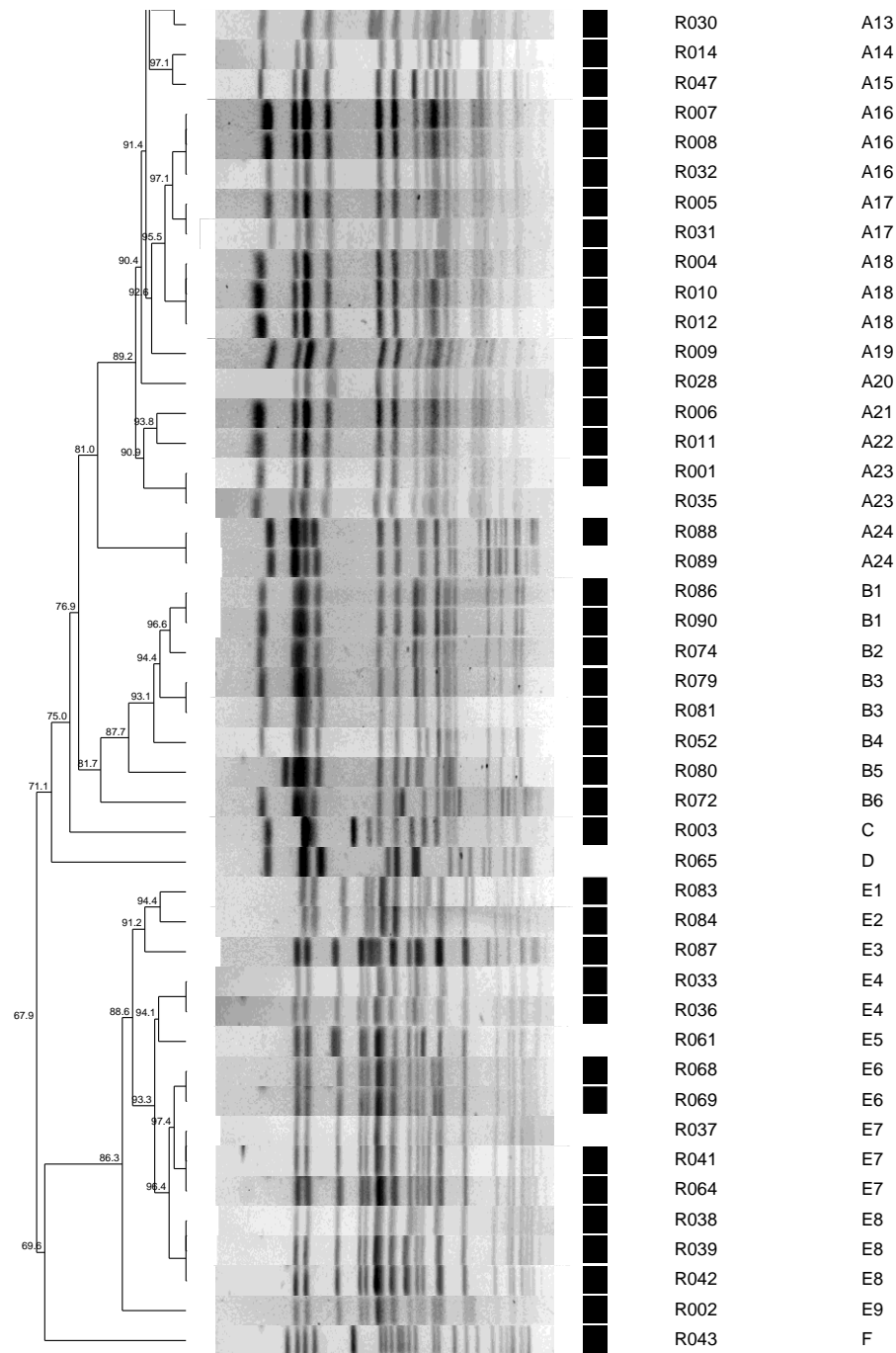


Figure 6 – Dendrogram showing the grouping of the 90 isolates of CPRKp in clusters, from A to F, according to their genetic similarity, after evaluation using the Dice coefficient.

Figure 7 establishes a relationship between clusters determined by PFGE and the presence of plasmid genes investigated by the PCR technique. It reveals that among the 64 isolates belonging to cluster A, 60 (93,8%) carrying of the *bla_{KPC}* gene.

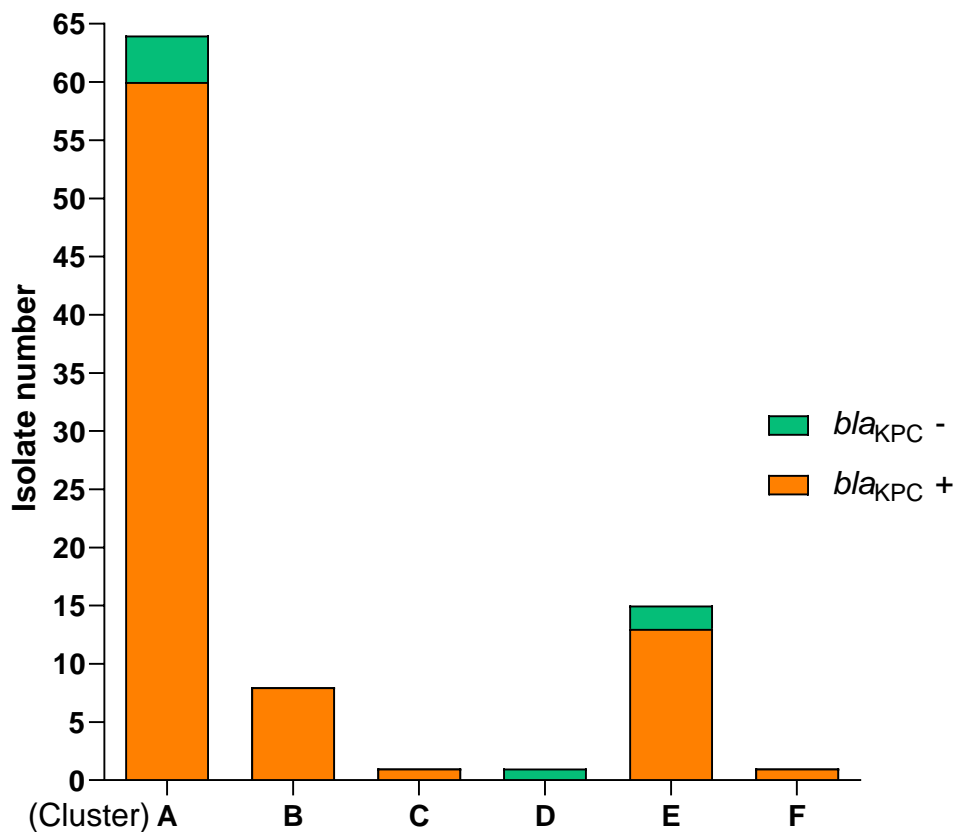


Figure 7 – Relationship between clusters and *bla*_{KPC} gene, showing a high prevalence of this carbapenemase enzyme in the isolates studied.

3.3. Only a single one isolate exhibited a chromosomal mutation directly associated with polymyxin B resistance

Following the PFGE technique, which categorized the 90 CPRKp isolates into clusters based on their similarity, six samples were chosen to WGS using the Illumina MiSeq® platform. The selection included 2 isolates from cluster A (R022 and R040), the most prevalent cluster, 2 isolates from cluster E (R038 and R064), the second most prevalent, and 2 isolates representing the least prevalent clusters (R086, from cluster B, and R065, from cluster D).

The performance of this technique allowed identify the sequenced isolates as *Klebsiella pneumoniae* through of ribosomal multilocus sequences typing (rMLST) analysis. Furthermore, the sequencing of KL locus, a genomic region containing genes

responsible for encoding capsule synthesis allowed for capsule characterization. In cluster A isolates, the locus with the most significant correspondence was KL 107. Cluster E isolates exhibited the best correspondence was KL 51. For the isolate of cluster B, the identified locus was KL 151, and for the sample of cluster D the identified locus was KL 17.

Housekeeping genes sequencing facilitated the determination of core genome MLST (cgMLST). The analysis revealed that isolates from cluster A are categorized as ST258, while those from cluster E are identified as ST16. Additionally, the isolate from cluster B corresponds to ST340, and the one from cluster D aligns with ST101, as illustrated in Figure 8.

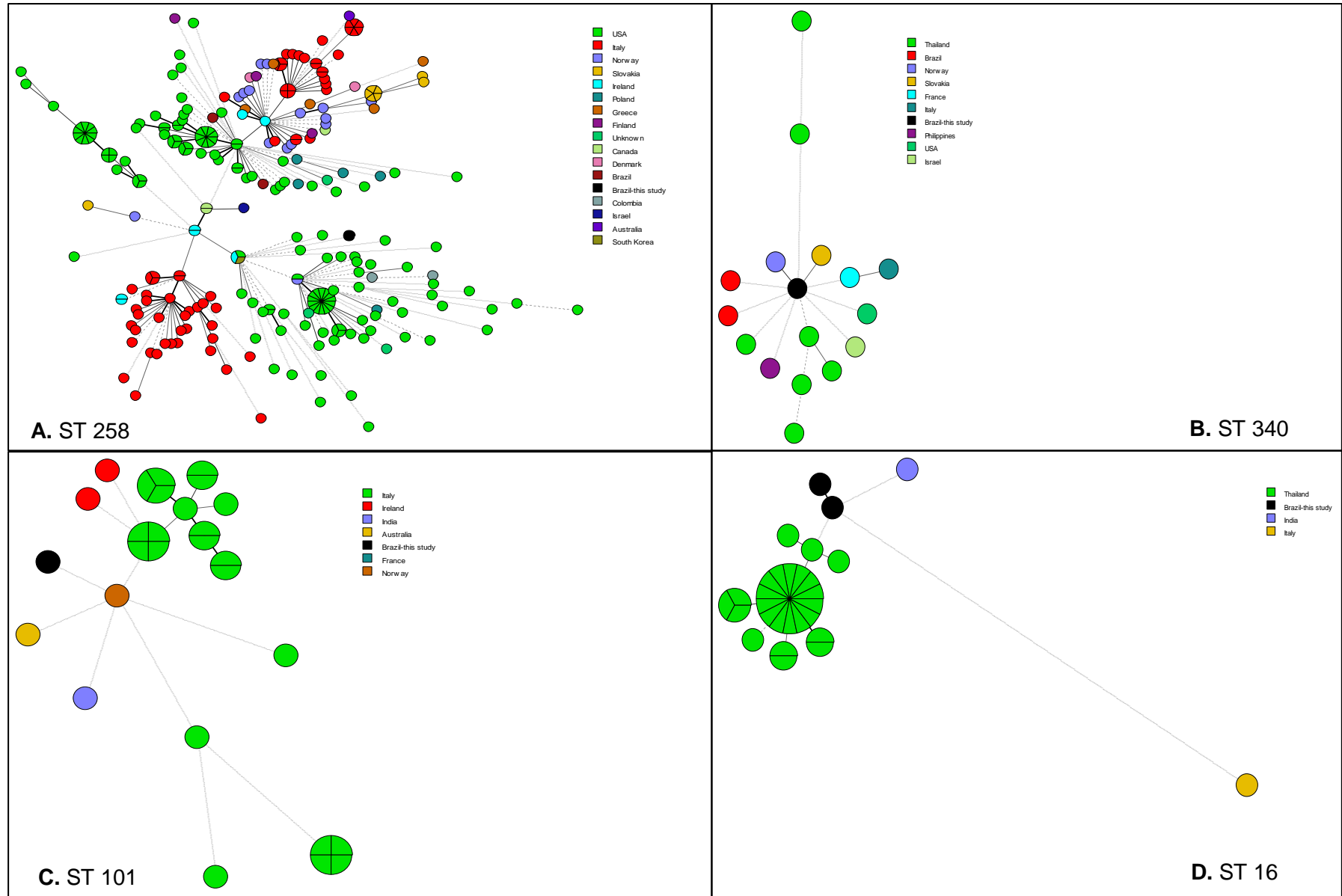


Figure 8 – Minimum extent tree of allelic similarity generated from the cgMLST analysis of the 6 CPRKp isolates submitted to WGS compared to the strains collected from the MLST 2.0 database. (A) – ST 258, (B) – ST 340, (C) – ST 101 and (D) – ST 16.

Figure 9 presents the results derived from the WGS data analysis for the isolates. The presence of resistance genes to multiple classes of antimicrobials, including fluoroquinolones, aminoglycosides, tetracyclines, and β -lactams, along with the detection of carbapenemase enzymes, aligns with the PCR findings. The figure also illustrates the incompatibility groups associated with the identified resistance plasmids and the expression of mutations in the AcrAB efflux pump gene, AcrR.

Regarding chromosomal mutations related to polymyxin B resistance, alterations were investigated in several genes associated with the insertion of L-Ara4N and pEtN to the lipid A fraction of bacterial LPS, such as *phoP*, *phoQ*, *pmrA* and *pmrB*, *mgrB*, *crrB*, *ramA* and *pmrC* genes. For most of the selected isolates, the genes found were of the wild type or there were still mutations characteristic of the determined ST's; only for one of the samples, R040, belonging to cluster A, a chromosomal mutation was found in the *pmrB* gene, directly associated with resistance to polymyxin B. For two samples, the same R040 and R022, also from cluster A, point mutations in the *phoQ* gene were found, absent in global other ST258 isolates, according to information obtained from the MLST database, which may be related to polymyxin resistance (Table 1).

Table 1 – Compiled data on isolates submitted to WGS, with emphasis on mutations in chromosomal genes related to resistance to polymyxin B.

ID	PFGE	ST	polymyxin B MIC	eptB	pmrA	pmrB	arnT	mgrB	crrB	phoP	phoQ	pmrC	ram
R040	A1	258	4	wild	wild	T157P	wild	wild	wild	wild	V24G G443D	wild	wild
R022	A7	258	32	wild	wild	wild	wild	wild	wild	wild	V24G	wild	wild
R086	B1	340	16	wild	wild	wild	wild	wild	L296Q	wild	wild	wild	wild
R065	D	101	8	wild	A217V	G256R	G164S M177I	wild	not found	wild	wild	G25S F27C	wild
R064	E7	16	8	A429E	E57G	G256R	wild	wild	L296Q	wild	wild	F27C R319Q	wild
R038	E8	16	32	A429E	E57G	G256r	wild	wild	L296Q	wild	wild	F27C R319Q	wild

* Wild = selvage type gene. Normal letters = mutations previously associated with the respective ST, unrelated to resistance to polymyxin B. Bold letters = point mutations probably associated with resistance to polymyxin B. Red Letters = mutation in chromosomal gene associated with polymyxin B resistance.

4. DISCUSSION

The analysis of WGS data revealed that polymyxin B resistance in the sequenced CPRKp isolates was associated with alterations in the lipid A fraction of bacterial LPS due to chromosomal mutations in genes related with activity and regulation of TCS PhoPQ and PmrAB in the cluster A isolates. Moreover, none of sequenced isolates had enzymes encoded by plasmid genes, such as *mcr-1*.

It is important to highlight that the PCR technique did not detect the *mcr-1* plasmid gene, a finding that was consistent with WGS data. However, the extensive presence of *bla_{KPC}* plasmid genes among the 90 isolates (92.2%), as well as the absence of other plasmid genes related to carbapenem resistance. The isolates that did not present the *bla_{KPC}* gene (7.8%) also did not have other genes that coded for the expression of carbapenemases, such as *bla_{NDM}* and *bla_{OXA-48}*. Several authors have described the extensive dissemination of the *bla_{KPC}* gene in Brazil. For instance, Maya et al. (26) evidenced the wide dissemination of the *bla_{KPC}* gene in the Brazilian territory since its first detection in 2005 in Pernambuco (27), associated with several ST's. Zavascki et al. (28) reported a KPC-producing *K. pneumoniae* isolated also in 2005 in Santa Catarina, evidencing the rapid dissemination of the *bla_{KPC}* gene across the country. Escandón-Vargas et al. (29) also reported the wide spread of the *bla_{KPC}* gene in Brazil and other South American countries. Sampaio and Gales (30) highlighted the wide dissemination of the *bla_{KPC}* gene in Brazil, as well as the importance of its detection, given the increasing concern about carbapenem resistance and the expression of other carbapenem resistance genes.

Carbapenem resistance independent of carbapenemase enzymes has also been widely discussed. In these cases, resistance occurs due to changes in the

permeability of the outer membrane, because loss of porins and/or by the overexpression of efflux pumps, associated with the overproduction of β -lactamase enzymes of the AmpC or ESBL type (31-33). Through the analysis of the data obtained by the WGS from the six sequenced isolates, it was possible to identify mutations in genes encoding the expression of OmpK36 and OmpK37 porins, as well as in genes related to the expression of the AcrAB efflux pump; ESBL-type enzymes such as SHV-1 and SHV-11 and CTX-M-14 and CTX-M-15 were also identified. These findings, together, are directly related to carbapenem resistance.

The analysis of cgMLST enabled the identification of STs to which the selected isolates belong, with those in cluster A being attributed to ST 258. Bush et al. (34) underscored that ST 258 ranks among the most globally disseminated types, with a direct association to the spread of the *bla_{KPC}* gene. Pitout et al. (35) additionally noted that ST 258 forms an integral part of clonal complex (CC) 258, encompassing STs 11, 437, and 340 – the latter identified in one of our samples belonging to cluster B – as well as 512, representing single-locus variants of ST 258. Both Bush and Pitout emphasized the pivotal role of ST 258 in the dissemination of the *bla_{KPC}* gene, highlighting its hybrid nature composed of clades I and II. Clade I is predominantly associated with the KPC-2 enzyme, while clade II is linked to the KPC-3 enzyme. Bowers et al. (36) highlighted the swift global spread of this ST, reaching pandemic proportions. Woodford et al. (37) classified ST 258 as a high-risk clone closely tied to the proliferation of antibiotic resistance. It is noteworthy, as confirmed by PCR analysis, that one isolate in cluster A / ST258 exhibited genes responsible for the expression of the KPC-2 enzyme, whereas the other did not.

A data analysis of demographic information revealed that isolates belonging to cluster A are endemic in the hospital, as they have been present since the beginning

of isolate selection in 2016. They were found over the subsequent years in patients treated in the ICU, various hospital wards, and even in outpatients. In fact, 50% of isolates recovered from outpatients were grouped in cluster A, representing 4.68% of these. This indicates their widespread dissemination both within and outside the hospital.

The isolates grouped in cluster B / ST 340, however, began to be identified in the hospital from the year 2018, managing to cause infections even in a location endemic to another cluster/ST. Safavi et al. (38), in their systematic review, emphasized the significance of ST 340, associated with cluster B isolates, in the dissemination of the *bla*_{NDM} gene across the Americas, Europe, Asia, and Oceania, although it was not detected in our isolates.

The sample from cluster D was associated with ST 101; this ST belongs to clonal group (CG) 101, along with ST 1685, ST 2016, ST 2017 and ST 2502. Arcari et al. (39) highlighted that despite being a ST identified in the early 1990s, it has only recently been associated with the spread of carbapenem resistance due to the production of carbapenemase enzymes. It should be noted that the sample studied did not present *bla*_{KPC} gene.

Isolates from cluster E, the second most prevalent, were associated with ST 16. This particular sequence type, although not frequently reported, has gained prominence in recent years due to its association with carbapenem resistance and its involvement in hospital outbreaks, as documented by Nguyen et al. (40). In 2019, Andrey et al. (41) documented the emergence of KPC-producing *K. pneumoniae* strains belonging to ST 16 in a Brazilian tertiary hospital, characterized by the endemicity of strains within clonal complex 258. In our study, these samples were also notably prevalent and associated with the production of KPC-2 enzymes. The isolates

belonging to this cluster / ST were also founded throughout the specimen selection period, but were present in a much smaller proportion compared to the isolates belonging to the A/ST 258 cluster. We observed too that cluster E isolates were found in ICUs, several wards and outpatients. In fact, 33.3% of isolates recovered from outpatients were grouped in cluster E, representing 13.3% of these.

In an effort to identify polymyxin B resistance mechanisms, mutations in chromosomal genes related to PhoPQ and PmrAB were searched, given the absence of *mcr-1* gene (42,43). In fact, the *mcr* genes absence is quite relevant. Several authors have discussed the importance of *mcr* genes, which encode enzymes related to the addition of pEtN to the lipid A fraction of bacterial LPS in several parts of the world (21,44-46). Wang et al. (47) and Quiroga et al. (48) showed the spread of *mcr* genes worldwide, including in Brazil, indicating that although its prevalence is not so high, it is an important way of polymyxin B resistance dissemination.

Only two sequenced isolates, both of cluster A / ST 258, showed chromosomal mutations potentially associated with polymyxin B resistance, highlighting their low prevalence between the sequenced isolates. However, their relevance among cluster A isolates, which represents the largest of CPRKp isolates studied, is quite notable.

Several authors have discussed the importance of chromosomal mutations in genes related to PhoPQ and PmrAB, as well as other genes such as *pmrC*, *mgrB*, *crrB* and *ramA* in the polymyxin B resistance (11-17,49-54). Jayol et al. (55) described the association of point mutation in the *pmrB* gene, which led to the modification of a single amino acid, as responsible for resistance to polymyxin B in isolates of *K. pneumoniae* of worldwide distribution.

Due to the low frequency of mutations that could lead to alterations in the

outer membrane among isolates belonging to clusters others than cluster A, it was inferred that mutations in genes associated with the expression of the AcrAB efflux pump, as indicated in the WGS, along with changes in the polysaccharide capsule expression, might have hindered the polymyxin B access to these bacteria, thereby influencing their resistance. Numerous authors, in their reviews on the mechanisms of polymyxin B resistance, have recognized that efflux pumps expression and alterations in the polysaccharide capsule as crucial factors linked to resistance against this drug (11-16, 20, 56).

It is important to highlight certain limitations in our study. Polymyxin B resistance is a multifaceted phenomenon involving a cascade of genes, regulators, and operons, and it's plausible that not all of them have been thoroughly addressed in the WGS. Additionally, the intricacies of polymyxin B resistance are still under investigation, and there may be mechanisms not entirely elucidated that could be implicated. Finally, it is notable that the restricted number of sequenced isolates belonging to cluster A limits more precise conclusion about mutations related to polymyxin B resistance in isolates belonging to this cluster.

5. CONCLUSION

Taken together, the results obtained indicate that the polymyxin B resistance in our isolates is associated with changes in the lipid A fraction of the bacterial LPS due to chromosomal mutations in the genes *pmrB* and *phoQ*, associated with activity of the PhoPQ and PmrAB TCS, for the isolates belonging to cluster A / ST 258. However, for the isolates belonging to other clusters / STs, the resistance to this

drug appears to be associated with efflux pumps or the polysaccharide capsule overexpression.

REFERENCES

1. Karami-Zarandi M, Rahdar HA, Esmaeili H, Ranjbar R. *Klebsiella pneumoniae*: An update on antibiotic resistance mechanisms. *Future Microbiol.* 2023;18(1):65–81.
2. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(17):1–17.
3. Dong N, Yang X, Chan EWC, Zhang R, Chen S. *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *eBioMedicine.* 2022;79:103998.
4. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8(January):1–15.
5. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;(February):252–75.
6. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2018;45:131–9.
7. Bengoechea A, Pessoa JS. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: Living to counteract host defences. *FEMS Microbiol Rev.* 2019; (September 2018):123–

- 44.
8. Nang SC, Azad MAK, Velkov T, Zhou Q, Li J. Rescuing the last-line polymyxins: Achievements and challenges. *Pharmacol Rev.* 2021;73(2):679–728.
 9. Velkov T, Thompson PE, Azad MAK, Roberts KD, Bergen PJ. History, chemistry and antibacterial spectrum. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1145:15–36.
 10. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: New insights into an ‘old’ class of antibiotics. *Futur Microbiol.* 2013;8(6):1–20.
 11. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(2):557–96.
 12. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014;5(November):1–18.
 13. Moffatt JH, Harper M, Boyce JD. Mechanisms of polymyxin resistance. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1145:55–71.
 14. Bakthavatchalam YD, Pragasam AK, Biswas I, Veeraraghavan B. Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An

- update. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;12:124–36.
15. Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49(5):526–35.
 16. Moubareck CA. Polymyxins and bacterial membranes: A review of antibacterial activity and mechanisms of resistance. *Membranes (Basel)*. 2020;10(8):1–30.
 17. Bhagirath AY, Li Y, Patidar R, Yerex K, Ma X, Kumar A, et al. Two component regulatory systems and antibiotic resistance in Gram-negative pathogens. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1–30.
 18. Pitt ME, Elliot AG, Cao MD, Ganesamoorthy D, Karaiskos I, Giamarellou H, et al. Multifactorial chromosomal variants regulate polymyxin resistance in extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Genomics*. 2018;4(3).
 19. Mmatli M, Mbelle NM, Maningi NE, Osei Sekyere J. Emerging transcriptional and genomic mechanisms mediating carbapenem and polymyxin resistance in Enterobacteriaceae: A systematic review of current reports . *mSystems*. 2020;5(6):1–20.
 20. Rodríguez-Santiago J, Cornejo-Juárez P, Silva-Sánchez J, Garza-Ramos U. Polymyxin resistance in Enterobacteriaceae: Overview and epidemiology in the Americas. *Int J Antimicrob Agents*. 2021;58(5).

21. Sun J, Zhang H, Liu YH, Feng Y. Towards understanding MCR-like colistin resistance. *Trends Microbiol.* 2018;26(9):794–808.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 33th ed. CLSI supplement M100S. Wayne PA; CLSI:2023;1-402.
23. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(1):119–23.
24. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):161–8.
25. CDC PulseNet. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157: H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. 2017;157(PNL05):1–16.
26. Maya JJ, Ruiz SJ, Blanco VM, Gotuzzo E, Guzman-Blanco M, Labarca J, et al. Current status of carbapenemases in Latin America. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013; 11(7):657-667.
27. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-

- 2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(1):333–4.
28. Zavascki AP, Zoccoli CM, Machado AB, Oliveira KR, Superti S V, Pilger DA, et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: A widespread threat in waiting? *Int J Infect Dis.* 2010;14:e539–40.
29. Escandón-Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas MV. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2016; 15(3):277-297.
30. Sampaio JLM, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Brazilian J Microbiol.* 2016;47:31–7.
31. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis.* 2019;69(Suppl 7):S521–8.
32. Pulzova L, Navratilova L, Comor L. Alterations in outer membrane permeability favor drug-resistant phenotype of *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* 2016;00(00):1–8.
33. Karampatakis T, Tsergouli K, Behzadi P. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Virulence factors, molecular epidemiology and latest updates in treatment options. *Antibiotics.* 2023;12(234):1–23.

34. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(2):1–37.
35. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):5873–84.
36. Bowers JR, Kitchel B, Driebe EM, MacCannell DR, Roe C, Lemmer D, et al. Genomic analysis of the emergence and rapid global dissemination of the clonal group 258 *Klebsiella pneumoniae* pandemic. *PLoS ONE.* 2015; 10(7):e0133727.
37. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011; 35:736-755.
38. Safavi M, Bostanshirin N, Hajikhami B, Yaslianifard S, van Belkum A, Goudarzi M, et al. Global genotype dissemination of human clinical isolates of New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*; a systematic review. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020; 420-429.
39. Arcari G, Carattoli A. Global spread and evolutionary convergence of multidrug-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* high-risk clones. *Pathogens and Global Health.* 2023; 117(4):328-341.

40. Nguyen TNT, Nguyen PLN, Le NTQ, Nguyen LPH, Duong TB, Ho NDT, et al. Emerging carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 16 causing multiple outbreaks in a tertiary hospital in southern Vietnam. *Microbiol Genomics*. 2021; 7:000519.
41. Andrey DO, Dantas PP, Martins WBS, Carvalho FM, Almeida LGP, Sands K, et al. An emerging clone, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* sequence type 16, associated with high mortality rates in a CC258-endemic setting. *Clin Infect Dis*. 2020; 71(7):e141-50.
42. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance*. 2018;23(6):1–11.
43. Wang Y, Tian GB, Zhang R, Shen Y, Tyrrell JM, Huang X, et al. Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: An epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(4):390–9.
44. Quan J, Li X, Chen Y, Jiang Y, Zhou Z, Zhang H, et al. Prevalence of *mcr-1* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* recovered from bloodstream infections in China: A multicentre longitudinal study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(4):400–10.

45. Ovejero CM, Delgado-Blas JF, Calero-Caceres W, Muniesa M, Gonzalez-Zorn B. Spread of mcr-1-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(4):1050–3.
46. Zurfluh K, Stephan R, Widmer A, Poirel L, Nordmann P, Nuesch HJ, et al. Screening for fecal carriage of MCR-producing Enterobacteriaceae in healthy humans and primary care patients. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2017;6(1):7–10.
47. Wang R, Van Dorp L, Shaw LP, Bradley P, Wang Q, Wang X, et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. *Nat Commun.* 2018;9(1):1–9.
48. Quiroga C, Nastro M, Di Conza J. Current scenario of plasmid-mediated colistin resistance in Latin America. *Rev Argent Microbiol.* 2019;51(1):93–100.
49. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Türkoglu S, et al. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(1):75–80.
50. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, Pilato V Di, Arena F, Conte V, et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(10):5696–703.

51. Aires CAM, Pereira PS, Asensi MD, Carvalho-Assef APDA. mgrB mutations mediating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal surveillance swabs in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(11):6969–72.
52. Mcconville TH, Annavajhala MK, Giddins MJ, Macesic N, Herrera CM, Rozenberg FD, et al. CrrB positively regulates high-level polymyxin resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Cell Rep.* 2020;33(4):108313.
53. Jayol A, Nordmann P, Brink A, Villegas MV, Dubois V, Poirel L. High-level resistance to colistin mediated by various mutations in the crrB gene among carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(11):1–4.
54. De Majundar S, Yu J, Fookes M, McAteer SP, Llobet E, Finn S, et al. Elucidation of the RamA regulon in *Klebsiella pneumoniae* reveals a role in LPS regulation. *PLoS Pathog.* 2015; 11(1):e1004627.
55. Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas MV, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(8):4762–6.
56. Eicher T, Brandstätter L, Pos KM. Structural and functional aspects of the multidrug efflux pump AcrB. *Biol Chem.* 2009; 390(8):693-9.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

- A resistência aos carbapenêmicos está relacionada com a produção de enzimas carbapenemases do tipo KPC, já que o gene *bla_{KPC}* foi encontrado em 92,2% dos isolados, sendo que nos casos em que este gene se fazia ausente, a resistência foi associada à perda de porinas e/ou hiperexpressão de bombas de efluxo associadas à expressão de enzimas ESBL;
- Identificou-se um clone dominante, o cluster A, pertencente ao ST 258, que compreende 71,1% dos isolados;
- A resistência à polimixina B não está relacionada com a expressão de enzimas que modificam a estrutura do LPS bacteriano codificadas por plasmídeos, como a *mcr-1*;
- A identificação de mutação cromossomal no gene *pmrB* em um isolado sequenciado pertencente ao cluster A / ST 258, bem como a identificação de mutação pontual no gene *phoQ* em dois isolados sequenciados, ambos pertencentes ao cluster A / ST 258, permite inferir que a resistência à polimixina B nos isolados pertencentes a este cluster seja devido a mutações em genes associados com a atividade dos TCS PhoPQ e PmrAB;
- A ausência de mutações cromossomais nos genes associados à atividade e regulação dos TCS PhoPQ e PmrAB para os isolados pertencentes aos demais clusters / ST's, permite sugerir que, nestes, a resistência à polimixina B esteja associada à hiperexpressão de bombas de efluxo e/ou de cápsula polissacarídica.

APÊNDICE

APÊNDICE 01**Tabela 1:** Dados obtidos a partir das solicitações de cultura e seus respectivos antibiogramas, além do PFGE e da PCR^{*,***}.

ID	MIC polimixina B**	Data do isolamento	Local de isolamento	Material biológico	AMI	GEN	TIG	PFGE	KPC
R040	4	Fevereiro/2018	UTI (Adulto)	Sangue	R	R	S	A1	+
R046	32	Março/2018	UTI (Adulto)	Urina	R	R	S	A1	+
R049	≥ 64	Abril/2018	UTI (Adulto)	Secreção traqueal	R	R	S	A1	+
R050	≥ 64	Abril/2018	Enfermaria (Unidade Coronariana)	Sangue	R	R	S	A1	+
R051	≥ 64	Maio/2018	UTI (Adulto)	Ponta de cateter	R	R	S	A1	+
R053	4	Maio/2018	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	R	R	S	A1	+
R054	16	Junho/2018	UTI (Adulto)	Sangue	R	R	S	A1	+
R055	8	Junho/2018	UTI (Adulto)	Urina	R	R	S	A1	+
R056	4	Junho/2018	UTI (Adulto)	Ponta de cateter	R	R	S	A1	+
R057	≥ 64	Junho/2018	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	R	R	S	A1	+
R058	16	Junho/2018	UTI (Adulto)	Urina	R	R	S	A1	+

R059	32	Junho/2018	UTI (Clínica Médica)	Secreção (em geral)	R	R	S	A1	+
R060	16	Julho/2018	UTI (Adulto)	Urina	R	R	S	A1	+
R062	≥ 64	Julho/2018	Enfermaria (Clínica Médica)	Secreção traqueal	R	R	S	A1	+
R063	≥ 64	Julho/2018	UTI (Adulto)	Urina	R	R	S	A1	+
R066	≥ 64	Julho/2018	UTI (Adulto)	Urina	R	R	S	A1	+
R067	≥ 64	Agosto/2018	UTI (Coronariana)	Urina	R	R	S	A1	+
R070	8	Julho/2018	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	S	S	S	A1	+
R073	≥ 64	Agosto/2018	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	R	R	S	A1	+
R075	≥ 64	Agosto/2018	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	R	R	S	A1	+
R082	≥ 64	Setembro/2018	UTI (Adulto)	Secreção traqueal	S	S	S	A1	+
R085	≥ 64	Outubro/2018	Enfermaria (Clínica Médica)	Secreção (em geral)	R	R	S	A1	+
R048	≥ 64	Abril/2018	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	R	R	S	A2	+
R071	≥ 64	Abril/2018	UTI (Adulto)	Urina	R	R	S	A3	+
R013	16	Setembro/2016	UTI (Adulto)	Urina	R	R	S	A4	+
R015	16	Setembro/2016	UTI (Coronariana)	Secreção traqueal	R	R	S	A4	+

R016	8	Outubro/2016	Enfermaria (Clínica Médica)	Secreção traqueal	R	R	S	A4	+
R026	8	Outubro/2016	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	R	R	S	A5	+
R029	32	Dezembro/2016	UTI (Adulto)	Sangue	R	R	S	A5	+
R034	4	Julho/2017	UTI (Coronariana)	Ponta de cateter	S	S	S	A6	+
R017	16	Outubro/2016	UTI (Adulto)	Líquido cavitário	R	R	S	A7	+
R018	32	Outubro/2016	UTI (Adulto)	Urina	R	R	S	A7	+
R019	16	Novembro/2016	UTI (Adulto)	Líquido cavitário	R	R	S	A7	+
R020	4	Novembro/2016	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	S	S	S	A7	+
R021	16	Novembro/2016	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	R	R	S	A7	+
R022	32	Novembro/2016	UTI (Adulto)	Urina	R	R	S	A7	-
R024	16	Dezembro/2016	UTI (Adulto)	Secreção traqueal	R	R	S	A7	+
R025	8	Dezembro/2016	Enfermaria (Clínica Médica)	Sangue	R	R	S	A7	+
R027	16	Dezembro/2016	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	R	R	S	A7	+
R045	16	Março/2018	Enfermaria (Emergência)	Urina	S	S	S	A7	+
R076	≥ 64	Agosto/2018	UTI (Adulto)	Secreção traqueal	S	S	S	A9	+
R077	≥ 64	Agosto/2018	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	S	S	S	A9	-
R078	≥ 64	Setembro/2018	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	R	R	S	A10	+

R044	4	Março/2018	Ambulatório	Urina	S	S	S	A11	+
R023	32	Novembro/2016	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	R	R	S	A12	+
R030	32	Janeiro/2017	UTI (Adulto)	Urina	R	R	S	A13	+
R014	16	Setembro/2016	UTI (Adulto)	Urina	R	R	S	A14	+
R047	≥ 64	Novembro/2018	UTI (Adulto)	Ponta de cateter	R	R	S	A15	+
R007	16	Agosto/2016	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	R	R	S	A16	+
R008	16	Agosto/2016	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	R	R	S	A16	+
R032	16	Maio/2017	Ambulatório	Urina	R	R	S	A16	+
R005	16	Julho/2016	UTI (Adulto)	Secreção traqueal	R	R	S	A17	+
R031	16	Fevereiro/2017	Ambulatório	Urina	R	R	S	A17	+
R004	32	Junho/2016	Enfermaria (Enfermaria)	Urina	R	R	S	A18	+
R010	16	Setembro/2016	UTI (Adulto)	Urina	R	R	S	A18	+
R012	32	Setembro/2016	UTI (Adulto)	Secreção traqueal	R	R	S	A18	+
R009	16	Agosto/2016	Enfermaria (Clínica Médica)	Secreção (em geral)	R	R	S	A19	+
R028	16	Dezembro/2017	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	R	R	S	A20	+
R006	16	Julho/2016	UTI (Adulto)	Ponta de cateter	R	R	S	A21	+

R011	32	Setembro/2016	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	R	R	S	A22	+
R001	32	Abril/2016	UTI (Adulto)	Sangue	R	R	S	A23	+
R035	16	Setembro/2017	UTI (Coronariana)	Urina	R	R	S	A23	-
R088	16	Novembro/2018	UTI (Adulto)	Secreção traqueal	S	S	S	A24	+
R089	16	Dezembro/2018	UTI (Pediátrica)	Urina	S	R	S	A24	-
R086	8	Outubro/2018	Enfermaria (Clínica Médica)	Secreção (em geral)	S	R	S	B1	+
R090	4	Dezembro/2018	UTI (Adulto)	Ponta de cateter	S	R	S	B1	+
R074	4	Agosto/2018	Enfermaria (Emergência)	Urina	S	R	S	B2	+
R079	32	Setembro/2018	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	S	R	S	B3	+
R081	4	Setembro/2018	UTI (Queimados)	Sangue	S	R	S	B3	+
R052	≥ 64	Maio/2018	UTI (Coronariana)	Urina	S	R	S	B4	+
R080	4	Setembro/2018	Enfermaria (Emergência)	Urina	S	R	S	B5	+
R072	8	Setembro/2018	UTI (Adulto)	Secreção traqueal	S	R	S	B6	+
R003	8	Maio/2016	UTI (Adulto)	Sangue	S	S	S	C	+
R065	8	Julho/2018	UTI (Adulto)	Secreção traqueal	S	R	S	D	-

R083	4	Setembro/2018	Enfermaria (Clínica Médica)	Fragmento (em geral)	S	S	S	E1	+
R084	8	Setembro/2018	Ambulatório	Urina	S	S	S	E2	+
R087	4	Outubro/2018	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	S	S	S	E3	+
R033	8	Junho/2017	Enfermaria (Pediatria)	Urina	S	S	S	E4	+
R036	16	Outubro/2017	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	R	R	R	E4	+
R061	≥ 64	Julho/2018	Ambulatório	Urina	S	S	S	E5	-
R068	8	Julho/2018	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	S	S	S	E6	+
R069	8	Julho/2018	UTI (Queimados)	Secreção traqueal	S	S	S	E6	+
R037	≥ 64	Dezembro/2017	Enfermaria (Clínica Médica)	Secreção (em geral)	S	S	S	E7	-
R041	≥ 64	Fevereiro/2018	UTI (Coronariana)	Ponta de cateter	S	S	S	E7	+
R064	8	Julho/2018	UTI (Queimados)	Secreção traqueal	S	S	S	E7	+
R038	32	Novembro/2017	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	S	S	R	E8	+
R039	8	Dezembro/2017	UTI (Coronariana)	Secreção traqueal	S	S	R	E8	+
R042	≥ 64	Novembro/2017	Enfermaria (Clínica Médica)	Urina	R	S	S	E8	+
R002	8	Maio/2016	UTI (Adulto)	Sangue	S	S	S	E9	+

R043	2	Março/2018	Ambulatório	Urina	S	S	S	F	+
-------------	---	------------	-------------	-------	---	---	---	---	---

* Abreviaturas: ID – identificação, MIC – concentração inibitória mínima, AMI – ampicilina, GEN – gentamicina, TIG – tigeciclina, PFGE – *pulsed field gel electrophoresis*, PCR – *polymerase chain reaction*, UTI – Unidade de Tratamento Intensivo, S – sensível, R – resistente, + – presença do gene *bla_{KPC}*, - – ausência do gene *bla_{KPC}*.

** A determinação da MIC de polimixina B foi realizada seguindo as especificações dos documentos CLSI e BrCAST do ano de 2023.

*** Todas as amostras são resistentes para os carbapenêmicos imipenem, meropenem e ertapenem, além de não apresentarem os genes plasmidiais *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}* e *mcr-1*.