



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUANA SOARES DE MORAES

ESTUDO EPIDEMIOLOGICO E MOLECULAR DE *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE PACIENTES COM INFECÇÃO DA CORRENTE SANGUÍNEA EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

LUANA SOARES DE MORAES

ESTUDO EPIDEMIOLOGICO E MOLECULAR DE *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE PACIENTES COM INFECÇÃO DA CORRENTE SANGUÍNEA EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M827E Moraes, Luana Soares de .

Estudo epidemiológico e molecular de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes com infecção da corrente sanguínea em um hospital universitário / Luana Soares de Moraes. - Londrina, 2020.
62 f. : il.

Orientador: Eliana Carolina Vespero.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2020.
Inclui bibliografia.

1. *Klebsiella pneumoniae* - Tese. 2. Resistência aos antimicrobianos - Tese. 3. Carbapenêmicos - Tese. 4. Polimixinas - Tese. I. Carolina Vespero, Eliana. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

CDU 61

LUANA SOARES DE MORAES

ESTUDO EPIDEMIOLOGICO E MOLECULAR DE *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE PACIENTES COM INFECÇÃO DA CORRENTE SANGUÍNEA EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dr^a Jaqueline Dario Capobianco
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dr^a Renata Katsuko T. Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 06 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me concedeu força e sabedoria durante esses dois anos de mestrado.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Eliana, pela paciência durante esse processo, por toda dedicação que ela tem por seus alunos e por seu trabalho, além de todo conhecimento transmitido a mim.

A minha família, pelo suporte financeiro e emocional, por todo apoio e incentivo e por estarem ao meu lado em todos os momentos.

Aos docentes, mestrandos, estagiários e funcionários do Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário de Londrina, pela honra do convívio, por tantos ensinamentos passados e por me ajudarem durante as várias etapas do mestrado.

A todos os amigos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse a este dia, tão importante em minha vida.

MORAES, Luana Soares. **Estudo epidemiológico e molecular de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes com infecção da corrente sanguínea em um Hospital Universitário**. 2020. 63 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

Infecções da corrente sanguínea (ICS) estão associadas a alta morbimortalidade. Tem sido identificado um aumento preocupante na prevalência de resistência aos carbapenêmicos em cepas de *Klebsiella pneumoniae*, com uma grande proporção de resistência adicional à colistina, sendo esse um grande desafio terapêutico. Nesse contexto, avaliamos os fatores de risco, mortalidade e caracterizamos molecularmente isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase causadores de ICS em um hospital terciário no sul do Brasil. No período estudado, foram analisados 107 pacientes com ICS por *K. pneumoniae*, os isolados foram identificados pelo sistema automatizado VITEK2® (bioMérieux). Analisamos os dados clínicos e de sensibilidade aos antimicrobianos. E também realizamos testes fenotípicos, análises moleculares, análise genética por ERIC-PCR e análise estatística pelo programa SPSS versão 20.0. Dos 107 pacientes, 25 (23,3%) dos isolados de *K. pneumoniae* foram produtores de ESBL e 54 (50,5%) produtores de carbapenemases. Desses 54 isolados, 26 (24,3%) apresentaram resistência adicional às polimixinas. O gene *bla_{KPC}* estava presente em 90,4% (49/54) dos isolados, o gene *bla_{NDM}* em um isolado e em 7,4% (4/54) dos isolados nenhum dos genes testados foi detectado. Na análise genética, a maioria dos isolados apresentaram mais de 85% de similaridade, com a presença de 4 clones principais e 11 amostras não foram geneticamente relacionadas. A mediana de idade dos pacientes foi de 58 (40-70) anos e 60,7% (65/107) eram do sexo masculino. Ao comparar dois grupos de pacientes que apresentaram ICS por *K. pneumoniae*, com e sem resistência aos carbapenêmicos, as variáveis permanência em UTI, insuficiência renal, uso prévio de antimicrobianos, índice de comorbidade de Charlson, procedimentos invasivos e óbito mostraram diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Foi possível constatar os principais fatores associados ao desenvolvimento de ICS por *K. pneumoniae* e verificar que a produção de KPC foi o mecanismo mais frequente de resistência aos carbapenêmicos. O entendimento da epidemiologia ao longo do tempo é fundamental para a implementação de algumas medidas para prevenir a resistência e diminuir a mortalidade associada a esta. Além disso, nossos resultados podem ser utilizados para apoiar ações multidisciplinares destinadas a minimizar os efeitos da dispersão de microrganismos multirresistentes na taxa de mortalidade em pacientes com infecções graves.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*. Resistência aos Antimicrobianos. Carbapenêmicos. Polimixinas.

MORAES, Luana Soares. **Epidemiological and molecular study of *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with bloodstream infection in a University Hospital.** 2020. 63 p. Dissertation (Master in Clinical and Laboratory Physiopathology) - Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Bloodstream infections (BSIs) are associated with high morbidity and mortality. A worrying increase in the prevalence of carbapenem resistance has been identified in *Klebsiella pneumoniae* strains, with a large proportion of additional resistance to colistin, which is a major therapeutic challenge. In this context, we evaluated the risk factors, mortality and characterized molecularly isolated from *K. pneumoniae* carbapenemase producers that cause BSI in a tertiary hospital in southern Brazil. In the studied period, 107 patients with BSI by *K. pneumoniae* were analyzed, the isolates were identified by the automated system VITEK2® (bioMérieux). We analyzed clinical and antimicrobial sensitivity data. And we also carry out phenotypic tests, molecular analyzes, genetic analysis by ERIC-PCR and statistical analysis by SPSS version 20.0. Of the 107 patients, 25 (23.3%) of the *K. pneumoniae* isolates produced ESBL and 54 (50.5%) produced carbapenemases. Of these 54 isolates, 26 (24.3%) showed additional resistance to polymyxins. The *bla_{KPC}* gene was present in 90.4% (49/54) of the isolates, the *bla_{NDM}* gene in an isolate and in 7.4% (4/54) of the isolates none of the tested genes was detected. In genetic analysis, most isolates showed more than 85% similarity, with the presence of 4 main clones and 11 samples were not genetically related. The median age of patients was 58 (40-70) years and 60.7% (65/107) were male. When comparing two groups of patients who presented BSI due to *K. pneumoniae*, with and without carbapenem resistance, the variables ICU stay, renal failure, previous use of antimicrobials, Charlson's comorbidity index, invasive procedures and death showed a statistically significant difference between the groups ($p < 0.05$). It was possible to verify the main factors associated with the development of ICS by *K. pneumoniae* and verify that the production of KPC was the most frequent mechanism of resistance to carbapenems. An understanding of epidemiology over time is essential for the implementation of some measures to prevent resistance and decrease mortality associated with it. In addition, our results can be used to support multidisciplinary actions aimed at minimizing the effects of the dispersion of multi-resistant microorganisms on the mortality rate in patients with severe infections.

Key-words: *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Resistance. Carbapenems. Polymyxins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxo dos testes realizados e classificação da resistência dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* de 107 pacientes com infecção da corrente sanguínea. KpnS (*K. pneumoniae* sensível aos β -lactâmicos); KpnMR (*K. pneumoniae* resistente aos β -lactâmicos de amplo espectro); KpnCR (*K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos) e KpnPR (*K. pneumoniae* resistente às polimixinas)33

ARTIGO

Figure 1 – Dendrogram of 54 *K. pneumoniae* isolates, determinants and antimicrobial sensitivity profile. Amikacin (AK), gentamicin (GN), ciprofloxacin (CIP), sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT), piperacillin-tazobactan (PTZ), ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX), cefepime (FEP), ertapenem (ERT), imipenem (IMP), meropenem (MEM), tigecycline (TIG), colistin (COL). Gender: Feminine (F), Male (M). Sector: Emergency Room (ER), Female Ward (FW), Intensive Care Unit (ICU), Intensive Care Unit Burned (ICB), Male Ward (MW), Pediatric Ward (PW). Death: No (N), Yes (Y). Carba NP and Pol NP: Negative (N), Positive (P)41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes codificadores das enzimas blaGIM, blaIMP, blaKPC, blaNDM, blaOXA-48, blaSPM, blaVIM, MCR-1 e ERIC, sequência dos oligonucleotídeo, tamanho do fragmento amplificado e referências	34
---	----

ARTIGO

Table 1 – Demographic characteristics, mortality and variable assessed in patients of the HU-UEL with infection of the bloodstream by <i>Klebsiella pneumonia</i> , between 2015 and 2018	42
Table 2 – Results of stepwise logistic regression with groups with and without antimicrobial resistance and death as dependent variables	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CAMHB	Caldo Muller-Hinton Cátion Ajustado
CarbaNP	Carbapenemase Nordmann e Poirel
CDC	Control Disease Center
CIM – MIC	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
ERIC-PCR	Reação em cadeia da polimerase, baseada em sequências repetitivas intergênicas em Enterobacteriaceae
ESBL	β -lactamases de espectro estendido
E-ESKAPE	Enterobacter spp., Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, K. pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Escherichia coli
GES	Guiana extended-spectrum beta-lactamase
ICS – BSI	Infecção da corrente sanguínea
IMP	Imipinemase
KPC	Klebsiella pneumoniae carbapenemase
KpnCR	Klebsiella pneumoniae produtora de carbapenemase
KpnMR	Klebsiella pneumoniae produtora de ESBL
KpnPR	Klebsiella pneumoniae resistente às polimixinas
KpnS	Klebsiella pneumoniae susceptível aos β -lactâmicos
LACEN	Laboratório Central
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR	Multidrug-resistant bacteria
NDM	New Delhi metallo-beta-lactamase
PDR	Pandrug-resistant bacteria
PolNP	Polimixina Nordmann e Poirel
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatística
SENTRY	Antimicrobial Surveillance Program
SPM	São Paulo metallo-beta-lactamase
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
VIM	Verona Imipenemase
XDR	Extensive Drug Resistance

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	13
2.1	<i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	13
2.2	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	14
2.2.1	β -lactamases	15
2.2.2	β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL).....	16
2.2.3	Carbapenemases	16
2.2.4	Resistência às Polimixinas	18
2.3	INFECÇÃO DA CORRENTE SANGUÍNEA.....	20
2.4	EPIDEMIOLOGIA	21
2.4.1	Infecção da Corrente Sanguínea Associada a <i>K. pneumoniae</i> Resistente aos Carbapenêmicos.....	21
2.4.2	Infecção da Corrente Sanguínea Associada a <i>K. pneumoniae</i> Resistente às Polimixinas.....	23
2.4.3	Epidemiologia no Brasil	24
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	AMOSTRAS	28
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	28
4.3	DADOS DOS PACIENTES	28
4.4	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	29
4.4.1	Microdiluição em caldo	29
4.4.2	Carbapenemase Nordmann e Poirel (Carba NP)	29
4.4.3	Polimixina Nordmann e Poirel (Pol NP)	30
4.5	EXTRAÇÃO DO DNA	31
4.6	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	32
4.7	ELETROFORESE	32

4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5	RESULTADOS	35
6	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53
	ANEXOS	58

1. INTRODUÇÃO

A resistência aos antibióticos está aumentando para níveis perigosamente altos em todas as partes do mundo. Novos mecanismos de resistência estão surgindo e se disseminando globalmente, ameaçando nossa capacidade de tratar doenças infecciosas comuns (WHO, 2018). Nos anos 60, surgiram os primeiros relatos de microrganismos Gram-negativos resistentes aos antimicrobianos isolados de infecções, no entanto nos últimos anos tornou-se um problema global, considerado como uma ameaça à saúde pública (BAND et al., 2018).

Espécies de *Klebsiella* são considerados patógenos oportunistas, amplamente encontrados na boca, pele e intestino, bem como em ambientes hospitalares e dispositivos médicos (LI et al., 2014). No entanto, podem se disseminar para outros tecidos causando infecções graves, incluindo pneumonia, infecções do trato urinário, infecções da corrente sanguínea (ICS) e sepse (BENGOCHEA; PESSOA, 2019; HENNEQUIN; ROBIN, 2016; LEE et al., 2017; PACZOSA, 2016).

Ainda que existam controvérsias, diversos estudos comparativos demonstram a participação da resistência antimicrobiana como um fator de risco importante para o desfecho ruim em pacientes com ICS causadas por *K. pneumoniae* no ambiente hospitalar (XIAO et al., 2018; XU; SUN; MA, 2017).

A resistência a vários antimicrobianos β -lactâmicos foi encontrada pela primeira vez em *K. pneumoniae* no ano de 1983 e foi denominada de β -lactamase de espectro estendido (ESBL). A prevalência de *K. pneumoniae* produtora de ESBL tem aumentado e isso tem dificultado o manejo efetivo dessas infecções (AH; KIM; LEE, 2014). Com a maior frequência de microrganismos produtores de ESBL, os antimicrobianos carbapenêmicos, passaram a ser utilizados com mais frequência no tratamento destas infecções. No entanto, devido à pressão seletiva desenvolvida por estes antimicrobianos, têm sido observado índices crescentes de resistência a estes fármacos em uma variedade de microrganismos (BARAN; AKSU, 2016; ESPOSITO et al., 2017; YOUSFI et al., 2019).

Devido a emergência de microrganismos resistentes aos carbapenêmicos, bem como a falta de novos antimicrobianos contra patógenos Gram-negativos, foi reconsiderado o uso de antibióticos antigos para tratar estas infecções, neste contexto, o uso das polimixinas ressurgiu no arsenal terapêutico (BARON et al.,

2016; GIAMARELLOU, 2016; JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017). Com a maior frequência do isolamento de microrganismos que apresentam resistência a estes antimicrobianos, considerados como “último recurso” para o tratamento de pacientes com infecção por microrganismos extremamente resistentes, está se tornando uma questão crítica, em um número crescente de países (JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017).

Tem sido demonstrado um aumento alarmante na prevalência de resistência aos carbapenêmicos em isolados de *K. pneumoniae* de infecções da corrente sanguínea, com grande proporção demonstrando resistência adicional à colistina e apresentando um significativo desafio terapêutico sem precedentes com uma mortalidade inaceitavelmente maior (BALKHAIR et al., 2019). Na literatura, a taxa de mortalidade relatada das ICS por *K. pneumoniae* multirresistente varia, na maioria dos estudos entre 15 e 79% (DURDU et al., 2016; FRAENKEL-WANDEL et al., 2016; XU et al., 2018). Obviamente, a falha terapêutica tende a se mostrar mais frequente quanto mais abrangente se mostra o perfil de resistência do isolado envolvido na ICS, uma vez que a terapia empírica com um antimicrobiano ativo seja improvável nos casos de bactérias com extrema resistência (ZHANG et al., 2018).

Diante de uma variedade de mecanismos associados à resistência, da inexperiência dos clínicos quanto ao uso de polimixinas e da gravidade dos quadros clínicos, a mortalidade pode apresentar-se significativamente maior para ICS por isolados resistentes aos carbapenêmicos e polimixinas (GIACOBBE et al., 2015; ROJAS et al., 2016; TUMBARELLO et al., 2015). Portanto, a rápida detecção de bactérias resistentes, associada à implementação de medidas eficazes de controle de infecção, são de suma importância para evitar a disseminação de *K. pneumoniae* resistente às polimixinas (BRAUN et al., 2018).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

As bactérias pertencentes ao gênero *Klebsiella* (família Enterobacteriaceae) são bastonetes Gram-negativos, imóveis, geralmente capsulados, anaeróbios facultativos, não esporulam, fermentam vários carboidratos, inclusive a lactose; algumas espécies produzem urease e 2,3-butilenoglicol como produto final da fermentação da glicose (teste de Voges Proskauer) (FARMER; DEGNAN; PAYNE, 1999).

As bactérias da espécie *K. pneumoniae* são caracterizadas como microrganismos invasores, capacidade esta que é conferida pela presença de cápsula, a qual é essencial para sua virulência e é composta de uma camada espessa de polissacarídeo responsável pelo aspecto brilhante e mucoide das colônias em meio de cultura (BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014).

Em um estudo, *K. pneumoniae* foi agrupada em um acrônimo denominado “E-ESKAPE”. Também fazem parte desse grupo *Enterobacter* spp., *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Estes microrganismos são patógenos que representam significantes riscos aos pacientes, principalmente em ambientes hospitalares (HENNEQUIN; ROBIN, 2016; LESCAT et al., 2019). Os microrganismos E-ESKAPE são a principal causa de infecções associadas a assistência à saúde em todo o mundo (SIRIJAN SANTAJIT; NITAYA INDRAWATTANA, 2016), especialmente em indivíduos gravemente enfermos e imunocomprometidos. Esses microrganismos "escapam" constantemente dos efeitos dos antimicrobianos comumente usados e são uma ameaça crítica à saúde pública (PENDLETON; GORMAN; GILMORE, 2013). A atenção focada nesses microrganismos patogênicos é importante, pois alguns estudos demonstram que pacientes com microrganismos E-ESKAPE resistentes aos antibacterianos têm maior probabilidade de receber antibioticoterapia inadequada, resultando em maiores taxas de mortalidade e oportunidades de disseminação para outros pacientes (KARLOWSKY et al., 2017; POGUE et al., 2015).

Espécies de *Klebsiella* são consideradas patógenos oportunistas, amplamente encontrados na boca, pele e intestino, bem como em ambientes

hospitalares e dispositivos médicos (LI et al., 2014). No entanto, podem se disseminar para outros tecidos causando infecções potencialmente graves, incluindo pneumonia, infecções do trato urinário, infecção da corrente sanguínea (BENGOECHEA; SA PESSOA, 2019; HENNEQUIN; ROBIN, 2016; LEE et al., 2017; PACZOSA, 2016).

As infecções por *K. pneumoniae* são particularmente preocupantes entre neonatos, idosos e indivíduos imunocomprometidos (MAGILL et al., 2014). Este microrganismo também é responsável por um número significativo de infecções adquiridas na comunidade, em todo o mundo. As características que definem estas infecções são a capacidade de disseminação metastática e sua significativa morbidade e mortalidade (BENGOECHEA; SA PESSOA, 2019; PACZOSA, 2016). As infecções relacionadas à assistência à saúde por *K. pneumoniae* tendem a ser crônicas devido a duas principais razões: a produção de biofilme que *in vivo*, protege o patógeno de ataques das células da resposta imune do hospedeiro e dos antibacterianos; e a presença de multirresistência entre os isolados hospitalares de *K. pneumoniae* (LI et al., 2014).

2.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A descoberta dos antimicrobianos transformou a saúde humana e animal e são ferramentas poderosas para combater os microrganismos causadores de infecções. No entanto, um dos maiores desafios globais da saúde pública é combater os microrganismos, com o arsenal de antimicrobianos que temos atualmente. Vivemos em uma época em que as pessoas em todo o mundo estão morrendo por infecções intratáveis devido ao surgimento e a disseminação da resistência aos antimicrobianos. A resistência aos antibacterianos está emergindo para níveis perigosamente altos e novos mecanismos de resistência estão surgindo e se espalhando globalmente, ameaçando nossa capacidade de tratar doenças infecciosas comuns (CDC, 2018; WHO, 2018).

A resistência aos antimicrobianos é o melhor exemplo da rápida adaptação da bactéria a um novo ecossistema. A habilidade da bactéria em ampliar seu nicho ecológico, também na presença de determinados antibacterianos, pode explicar a aquisição de genes por transferência de material genético através de conjugação, transformação e transdução e/ou pelo acúmulo de mutações pontuais, levando a

modificações de genes existentes (SULTAN et al., 2018). Vários mecanismos de resistência estão envolvidos, entre eles: alteração conformacional e bioquímica do sítio alvo, alteração da permeabilidade da parede celular da bactéria ao antimicrobiano, efluxo ativo, inativação enzimática do antimicrobiano (ALVES; BEHAR, 2013).

K. pneumoniae possui grande habilidade em adquirir plasmídeos, as amostras costumam abrigar mais de um, incluindo pequenos plasmídeos que podem conter altos ou baixos números de cópias e genes capazes de conferir resistência aos antimicrobianos (HENNEQUIN; ROBIN, 2016). Espécies de *Klebsiella* são conhecidas como reservatórios de genes de resistência aos antibacterianos, que podem se disseminar para outras bactérias Gram-negativas. De fato, a maioria destes genes de resistência foram primeiramente descritos em *Klebsiella* spp. (BENGOECHEA; SA PESSOA, 2019).

2.2.1 β -lactamases

Os β -lactâmicos formam uma grande classe de antimicrobianos, incluindo penicilinas, cefens, monobactâmicos, carbapenêmicos e inibidores de β -lactamases. Estes fármacos possuem um anel β -lactâmico em sua estrutura molecular e são os antimicrobianos mais amplamente utilizados para tratamento de infecções bacterianas (HENNEQUIN; ROBIN, 2016).

A produção de β -lactamase é o principal mecanismo de resistência a este grupo de antimicrobianos em Enterobacteriaceae. Essas enzimas altamente diversificadas, hidrolisam β -lactâmicos no espaço periplasmático, evitando assim a ligação do β -lactâmico à proteína de ligação da penicilina (PBP) (SMITH, 2017).

Amostras de *K. pneumoniae* apresentam resistência intrínseca à ampicilina e à carbenicilina, a qual se deve à presença de genes em seu cromossomo que codificam as β -lactamases TEM-1 e SHV-1 (FARMER; DEGNAN; PAYNE, 1999). Cefalosporinas de primeira geração como cefalotina e cefalexina também são degradadas por estas enzimas (LIVERMORE, 1995). Como consequência do uso extensivo de antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro, na década de 80, microrganismos que produziam β -lactamases mediadas pelos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} desenvolveram ainda resistência a cefalosporinas de amplo espectro e

monobactâmicos, resultando na produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (NAUMOVSKI et al., 1992).

2.2.2 β -lactamase de Espectro Estendido (ESBL)

As ESBLs são enzimas capazes de hidrolisar todos os antimicrobianos β -lactâmicos, com exceção das cefamicinas (cefexitina e cefotetan), de carbapenêmicos (imipenem e meropenem) e de inibidores de β -lactamases. As bactérias produtoras de ESBL geralmente permanecem sensíveis à ação de inibidores de β -lactamases como sulbactam, ácido clavulânico e tazobactam. Esses inibidores formam um complexo proteico com a β -lactamase, bloqueando, desta maneira, a atividade hidrolítica dessas enzimas (HENNEQUIN; ROBIN, 2016).

Nos últimos anos, o surgimento e disseminação de Enterobacteriaceae produtoras de β -lactamases do tipo ESBL representam uma séria ameaça à saúde pública. A produção de ESBL é frequentemente acompanhada por outros mecanismos de resistência que proporcionam resistência cruzada com outros agentes antimicrobianos, como aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Pacientes com alto risco de infecções por isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL geralmente apresentam maior tempo de internação, maiores custos de tratamento e maior índice de mortalidade (TIAN et al., 2018).

A disseminação de bactérias produtoras de β -lactamases do tipo ESBL em Enterobacteriaceae comprometeu a sensibilidade as cefalosporinas em muitas áreas do mundo e levou ao aumento do uso dos carbapenêmicos que eram antibióticos estáveis e potentes contra as bactérias produtoras destas enzimas. O uso intenso de carbapenêmicos resultou na seleção e emergência de Enterobacteriaceae resistente a estes fármacos. Tais resistências foram observadas no final da década de 90 (BARAN; AKSU, 2016; BULIK et al., 2010; HENNEQUIN; ROBIN, 2016; TIAN et al., 2018).

2.2.3 Carbapenemases

A resistência aos carbapenêmicos é uma ameaça global à saúde pública. As infecções por bactérias Gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos, especialmente ICS são cada vez mais desafiadoras e tornaram-se uma grande

preocupação em todo o mundo (CODJOE; DONKOR, 2017).

A produção de carbapenemase, mediada por plasmídeos, é a causa mais importante e comum de resistência aos carbapenêmicos em Enterobacteriaceae. O aumento de plasmídeos contendo genes produtores de carbapenemases é considerado uma séria ameaça à saúde, porque pode elevar a propagação de resistência aos carbapenêmicos. Além disso, isolados resistentes aos carbapenêmicos, frequentemente, carregam genes de resistência a outras classes de antimicrobianos, incluindo fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e sulfametoxazol-trimetoprim, limitando as opções terapêuticas para o tratamento de infecção por *K. pneumoniae* (BARAN; AKSU, 2016).

Dois mecanismos diferentes são responsáveis pela resistência aos carbapenêmicos em Enterobacteriaceae: (1) hiperprodução de enzimas ESBL ou AmpC, combinadas com perda ou alteração da porina e/ou expressão de bomba de efluxo e (2) produção de enzimas do tipo carbapenemases (ZHAO et al., 2017).

As β -lactamases foram categorizadas por Ambler, de acordo com a estrutura molecular e divididas em quatro classes (A, B, C e D), segundo as diferenças em seus mecanismos catalíticos. Estas classes podem ser divididas em dois grupos: serino- β -lactamases (classes A, C e D) e metalo- β -lactamases (classe B) (BUSH; JACOBY, 2010). As carbapenemases de classe A (GES, KPC) são inibidas pelo ácido clavulânico; a classe B ou metalo- β -lactamases (VIM, IMP, NDM) são inibidas pelo ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) e permanecem inativas contra o aztreonam; e as oxacilinases da classe D, que não são afetadas pelo ácido clavulânico ou EDTA (BARAN; AKSU, 2016).

As carbapenemases mais frequentes em *K. pneumoniae* são as enzimas *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), uma enzima capaz de hidrolisar um amplo espectro de β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. A enzima KPC foi isolada pela primeira vez em 1996, e desde então, o cenário tornou-se alarmante devido ao seu alto potencial de disseminação, uma vez que a localização em plasmídios facilita a transferência de genes específicos (BARAN; AKSU, 2016). Vinte e quatro variantes de KPC foram identificadas, as quais apenas diferem por algumas mudanças nos aminoácidos, dessas variantes, sendo a KPC-2 a carbapenemase mais frequente (BARDET; ROLAIN, 2018).

Os isolados produtores da enzima KPC também se espalharam pelo mundo

todo. Em alguns países, como Israel, Grécia, Brasil e Colômbia, são endêmicos, enquanto em outros, como Austrália, Nova Zelândia e no Canadá, geralmente são importados de outros países (CODJOE; DONKOR, 2017; HENNEQUIN; ROBIN, 2016).

As infecções por *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos continuam a ser um desafio significativo associado à morbidade e mortalidade em todo o mundo. Na atualidade poucos antimicrobianos retêm atividade contra estes microrganismos, que incluem aminoglicosídeos, tigeciclina e ceftazidima associada a avibactam. Além destes, as polimixinas, incluindo a colistina, são importantes opções de tratamento (ROJAS et al., 2016).

2.2.4 Resistência às Polimixinas

A atividade antibacteriana das polimixinas baseia-se na interação eletrostática entre os antimicrobianos polipeptídicos catiônicos e porções carregadas negativamente, presentes no lípido A do ipopolissacarídeos (LPS), que formam a membrana externa de bactérias Gram-negativas (ESPOSITO et al., 2017). A ligação desestabiliza o conjunto de LPS desestruturando a membrana externa e, finalmente, resultando em vazamento citoplasmático e morte celular (ESPOSITO et al., 2017; SRINIVAS; RIVARD, 2017).

A classe dos antimicrobianos polimixina e colistina (também conhecido como polimixina B e polimixina E), compartilham semelhanças no mecanismo de ação e espectro de atividade (SRINIVAS; RIVARD, 2017). A única diferença apresentada na estrutura química é a presença de um aminoácido D-leucina na molécula de colistina na mesma posição onde existe um D-fenilalanina na molécula da polimixina B. A polimixina B é utilizada na forma de sulfato de polimixina B, enquanto a colistina é uma pró-droga, utilizada na forma de colistimetato de sódio que, após ser metabolizado, é transformado em colistina base, que é o princípio ativo do fármaco (AH; KIM; LEE, 2014; GALES; JONES; SADER, 2011).

As polimixinas foram originalmente introduzidas na década de 1950 para o tratamento de infecções por microrganismos Gram-negativos, mas deixaram de ser utilizadas em meados da década de 1970, devido às altas taxas de nefrotoxicidade e neurotoxicidade em paralelo ao surgimento de alternativas de tratamento menos tóxicas (AH; KIM; LEE, 2014; YOUSFI et al., 2019). No entanto, no início da década

de 1990, às polimixinas foram reintroduzidas na prática clínica, não devido a um melhor perfil de segurança, mas pelo aparecimento de mecanismos de resistência produzidos pelos bacilos Gram-negativos resistentes aos antimicrobianos de amplo espectro, como aos carbapenêmicos, cefalosporinas de 3^a e 4^a geração e fluoroquinolonas, amplamente utilizados no tratamento de infecções por estes microrganismos (ROJAS et al., 2016). Às polimixinas, incluindo a colistina, são consideradas como opção de tratamento de “última linha” para infecções por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (BRAUN et al., 2018; JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017; YANG et al., 2019; YOUSFI et al., 2019).

A resistência às polimixinas está relacionada às modificações na porção lipídica A do LPS bacteriano, levando a uma redução na interação eletrostática catiônica devido à adição de grupos carregados positivamente tais como 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) e fosfoetanolamina (pEtN) (GIAMARELLOU, 2016). A resistência as polimixinas também pode ser explicada por mutações cromossomais nos sistemas que regulam as alterações dos LPS bacterianos: PhoP-PhoQ (PhoPQ) e PmrA-PmrB (PmrAB) e em *K. pneumoniae* por alterações no gene *mgrB* (CANIAUX et al., 2017; GIAMARELLOU, 2016).

Até recentemente, a resistência às polimixinas estava sempre ligada a um mecanismo cromossomal, no entanto um novo mecanismo de resistência mudou completamente essa visão. Em novembro de 2015, descreveram pela primeira vez a resistência adquirida à colistina em *E. coli* da comunidade da China, em animais e seres humanos, atribuído ao gene *mcr-1*, mediado por plasmídeo (LIU et al., 2016). Este gene codifica uma fosfoetanolamina transferase que catalisa a adição de uma pEtN ao lipídio A, levando à diminuição da afinidade da colistina pelo LPS (ESPOSITO et al., 2017; GIAMARELLOU, 2016; JAYOL et al., 2018). Após a descoberta do primeiro gene que confere resistência às polimixinas, novos genes foram detectados e nomeados de *mcr-2* ao *mcr-8*. Estes genes descritos globalmente, foram isolados de animais e seres humanos (LIU et al., 2016; SUN et al., 2018; YANG et al., 2019). Embora tenha sido detectado e identificado pela primeira vez no final de 2015, outro estudo do mesmo grupo anunciou sua presença em amostras de *E. coli* resistentes à colistina nos anos 80, enquanto os registros mais antigos da Europa são de 2005 na França e em 2009 nos Países Baixos (BARON et al., 2016).

Por outro lado a colistina tem sido amplamente utilizada na medicina

veterinária há décadas, como um tratamento curativo, profilático e administrada na alimentação de suínos e aves como promotor de crescimento. O sulfato de colistina também é utilizado na indústria de frutos do mar para promover o crescimento de peixes. Acredita-se que o uso extensivo de colistina em animais resultou em alta pressão seletiva no ambiente veterinário, promovendo o surgimento desse novo plasmídeo. Devido a esta suposição a China proibiu o uso de colistina como aditivo alimentar para animais, que levaram à retirada de 8000 toneladas de colistina na medicina veterinária (GIAMARELLOU, 2016; YANG et al., 2019). No Brasil, o Laboratório Central (LACEN) passou a pesquisar este gene em amostras de humanos, tendo detectado o primeiro caso em dezembro de 2016. Seis meses após o primeiro caso, já existiam 12 isolados em humanos no Paraná. Diante deste cenário, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou no Diário Oficial da União, em 30 de novembro de 2016, a Instrução Normativa nº 45 proibindo o uso da colistina como promotor de crescimento a ser usado na alimentação animal (ANEEL, 2016).

O uso crescente de colistina na medicina humana e a recente descoberta da resistência mediada por via plasmidial, destacam a necessidade de métodos confiáveis e rápidos para o teste de sensibilidade às polimixinas e adoção de medidas contínuas de prevenção para controlar a disseminação de microrganismos multirresistentes (JAYOL et al., 2018). E com o aumento do uso de colistina nos últimos anos, os relatórios de resistência também têm aumentado. Isso é de grande preocupação, dado o número limitado de agentes antimicrobianos disponíveis para o tratamento de tais infecções (SRINIVAS; RIVARD, 2017).

2.3 INFECÇÃO DA CORRENTE SANGUÍNEA (ICS)

As ICS são caracterizadas como infecções graves, uma vez que são eventos agudos e geralmente resultam em graves disfunções de órgãos com risco de morte, tais como sepse e choque séptico (COHEN et al., 2015; LOONEN et al., 2014).

As ICS são a principal causa de morbimortalidade em pessoas de todas as idades (MUSICHA et al., 2017), particularmente em pacientes imunocomprometidos (MARTINEZ et al., 2014). Essas infecções são frequentes e apresentam condições de risco para a vida em ambiente hospitalar (MAGILL et al., 2014; WISPLINGHOFF et al., 2004). Globalmente, a ICS afeta cerca de 30 milhões de pessoas, levando a 6

milhões de mortes, com 3 milhões de recém-nascidos e 1,2 milhão de crianças que sofrem de sepse anualmente (FLEISCHMANN-STRUZEK et al., 2018).

As ICS são caracterizadas pela presença de microrganismos como, vírus, bactérias ou fungos viáveis na corrente sanguínea, que provocam respostas inflamatórias e geralmente estão acompanhados de alterações de parâmetros clínicos, laboratoriais e hemodinâmicos (VISCOLI, 2016). A incidência de ICS é atribuída a longos períodos de internamento, ao aumento do número de pacientes com imunidade comprometida e à aquisição de fatores de virulência e resistência por patógenos que atingem a corrente sanguínea (GOTO; AL-HASAN, 2013; PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS et al., 2017), além de fatores relacionados à falta de medidas de prevenção e controle de infecção (ERSHOVA et al., 2018). Os sintomas associados às ICS incluem, entre outros, febre ou hipotermia, calafrios, tônus vascular reduzido, diminuição da pressão arterial, alteração do estado mental, hiperventilação, transpiração excessiva e probabilidade de disfunção orgânica (MARTINEZ et al., 2014).

Na determinação de microrganismos responsáveis por ICS, as hemoculturas são o método microbiológico mais frequente porque são sensíveis e de fácil acesso (OPOTA et al., 2015). No entanto, este método não é ideal para microrganismos não cultiváveis e sua sensibilidade é diminuída quando o tratamento com o antimicrobiano foi iniciado antes da coleta de sangue. Embora tenha havido uma melhoria na saúde pública e nos cuidados médicos nos últimos tempos, a bacteremia continua sendo uma das principais causas de infecções e óbito (GOTO et al., 2017). Além disso, o padrão epidemiológico dos agentes responsáveis pelas ICS não é estático, mas mudam constantemente ao longo do tempo, exigindo a necessidade de vigilância frequente nos hospitais (WILSON et al., 2011).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

2.4.1 Infecção da Corrente Sanguínea Associada a *K. pneumoniae* Resistente aos Carbapenêmicos

Apesar de constituir a microbiota normal do trato gastrointestinal de humanos e animais, *K. pneumoniae* tornou-se um problema de saúde pública pois relaciona-se fortemente com infecções nosocomiais e com a emergência de resistência frente aos

antibacterianos disponíveis (ISHIDA, 2004). *K. pneumoniae* pode infectar diversos sítios corpóreos resultando em pneumonia, infecção de trato urinário, de pele e partes moles e ICS na população adulta (TIAN et al., 2018).

Ainda que existam controvérsias, diversos estudos comparativos demonstram a participação da resistência antimicrobiana como um fator de risco importante para o desfecho ruim em pacientes com ICS causadas por *K. pneumoniae* no ambiente hospitalar (XIAO et al., 2018; XU; SUN; MA, 2017).

Na literatura, a taxa de mortalidade relatada das ICS por *K. pneumoniae* multirresistente varia, na maioria dos estudos entre 15 e 79% (DURDU et al., 2016; FRAENKEL-WANDEL et al., 2016; XU et al., 2018). Existem diversos fatores que podem influenciar os dados de mortalidade em infecções sistêmicas e a amplitude dos percentuais ilustra a dificuldade de se separar a mortalidade da ICS daquela devido à gravidade dos processos relacionados a doença subjacente dos pacientes com bactérias multirresistentes (DIRSECIU, 2017).

Desta forma, pacientes internados em instituições de saúde encontram-se susceptíveis e expostos a esses microrganismos resistentes diante da necessidade de procedimentos invasivos e uso de antimicrobianos de amplo espectro. Assim, se observa a alta incidência de microrganismos produtores de KPC em pacientes de unidade intensiva, cirúrgicos, imunossuprimidos e com doenças crônicas, relacionadas a maiores índices de falha terapêutica (ALVES; BEHAR, 2013; XIAO et al., 2018). Além disso, idade avançada, infecções hospitalares, permanência na UTI, gravidade da doença e esquemas inadequados foram identificados como fatores de risco que contribuem para o aumento das taxas de mortalidade em pacientes com ICS por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (DEBBY et al., 2012; SHILO et al., 2013).

Um estudo dos EUA mostrou que a taxa de resistência aos carbapenêmicos entre isolados de *K. pneumoniae* de hemocultura foi de 3,6% (WALSH, 2018). Na China, um estudo de isolados de hemocultura relatou taxas gerais de prevalência de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos de 5,5% (XU; SUN; MA, 2017). Em alguns países da Europa, foram relatadas tendências de aumentos progressivos nas taxas de resistência aos carbapenêmicos em isolados de infecções invasivas causadas por *K. pneumoniae*. A prevalência de infecções invasivas por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos foi relatada em 49,8% na Grécia e 12,5% na Itália (MAGIORAKOS et al., 2013).

Um estudo da Dinamarca, demonstrou que os pacientes com bacteremia resistentes aos carbapenêmicos apresentaram maiores taxas de mortalidade (quase três vezes maior) quando comparados aos pacientes com bacteremia sensível aos carbapenêmicos, e com taxas de mortalidade em 30 dias de 62,1% e 21,9%, respectivamente (BALKHAIR et al., 2019). Vários outros estudos mostraram que a bacteremia causada por isolados resistentes aos carbapenêmicos está associada a uma mortalidade mais elevada quando comparada à bacteremia causada por isolados sensíveis ao carbapenêmicos (DAIKOS et al., 2014; KOHLER et al., 2017; FALAGAS et al., 2014).

Obviamente, a falha terapêutica tende a se mostrar mais frequente quanto mais abrangente se mostra o perfil de resistência do isolado envolvido na ICS, uma vez que a terapia empírica com um antimicrobiano ativo seja improvável nos casos de resistência extrema (ZHANG et al., 2018).

2.4.2 Infecção da Corrente Sanguínea Associada a *K. pneumoniae* Resistente às Polimixinas

Em consequência do crescimento de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos nos hospitais de todo o mundo, o amplo uso de polimixinas, incluindo a colistina, tem tido efeito significativo sobre a ocorrência de isolados resistentes também a esta velha classe de antimicrobianos (CARRILHO et al., 2016; ROJAS et al., 2016).

Ainda que as polimixinas sejam, muitas vezes, a única opção terapêutica efetiva para as ICS em instituições com altos índices de isolamento de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos, essa classe de antimicrobianos não costuma ser administrada empírica e isoladamente em razão de sua toxicidade e da possibilidade de desenvolvimento de resistência durante seu uso (CARRILHO, 2014; ZAVASCKI et al., 2018).

Em um estudo dos EUA sobre a resistência à colistina em bacteremia por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos relatou-se uma taxa de 13% (ROJAS et al., 2016). Um estudo semelhante da Itália encontrou uma alta taxa de resistência à colistina de 36,1% (CAPONE et al., 2013).

Um outro estudo também da Itália de controle de casos de ICS por *K. pneumoniae* resistentes a carbapenem, a mortalidade em 30 dias dos isolados de *K.*

pneumoniae produtores de carbapenemases e resistentes à colistina foi de 51% (GIACOBBE et al., 2015). Em outros estudos, esse excesso de mortalidade foi atribuído ao número limitado de opções antimicrobianas eficazes disponíveis para tratar infecções tão graves (GIACOBBE et al., 2015; ROJAS et al., 2016).

De acordo com o *Antimicrobial Surveillance Program* (SENTRY), as taxas de resistência global às polimixinas para *K. pneumoniae* atingiram 1,5% no período de 2009 a 2012. A maior taxa foi encontrada na América Latina (2,1%), seguida da América do Norte (1,8%). A resistência na América Latina aumentou gradualmente de 1,3% em 2006, para 3,0% em 2009. E taxas de resistência à colistina particularmente altas (20,0–55,2%) foram relatadas em pacientes da unidade de terapia intensiva (UTI) na América Latina (AH; KIM; LEE, 2014; SRINIVAS; RIVARD, 2017).

Tem sido demonstrado um aumento alarmante na prevalência de resistência aos carbapenêmicos em isolados de hemoculturas de *K. pneumoniae*, com uma grande proporção de *K. pneumoniae* demonstrando resistência adicional à colistina e apresentando um significativo desafio terapêutico sem precedentes com uma mortalidade inaceitavelmente maior (BALKHAIR et al., 2019). Diante de uma variedade de mecanismos associados à resistência, da inexperiência dos clínicos quanto ao uso de polimixinas e da gravidade dos quadros clínicos, a mortalidade pode apresentar-se significativamente maior para ICS por isolados resistentes aos carbapenêmicos e polimixinas (CAPONE et al., 2013; GIACOBBE et al., 2015; ROJAS et al., 2016; TUMBARELLO et al., 2015).

2.4.3 Epidemiologia no Brasil

A KPC é a carbapenemase mais frequentemente descrita nas *Enterobacteriaceae* no Brasil, com grande mortalidade (CORREA et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2015). Estudos brasileiros demonstraram a endemicidade da KPC, especialmente em *K. pneumoniae* (MONTEIRO et al., 2009). Como em outras partes do mundo, *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos se estabeleceu no Brasil como um grande problema de saúde pública na última década (DE OLIVEIRA et al., 2015; MONTEIRO et al., 2009). As infecções causadas pela *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos ocorrem com maior frequência em pacientes gravemente enfermos e as taxas de mortalidade são geralmente de 40% a

70% (BOSZCZOWSKI et al., 2019).

O SENTRY documentou um aumento significativo nas taxas de resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae* nos centros médicos brasileiros de 1997 a 1999 (0,5%) e 2008 a 2010 (8,6%) (GALES; JONES; SADER, 2011). Estes achados concordaram com outro estudo que documentou um aumento nas taxas de resistência aos carbapenêmicos, de 6,8% para 35,5% entre os anos de 2011 e 2015, em 3085 isolados de *K. pneumoniae* obtidos de hospitais brasileiros, onde a maioria dos isolados foram recuperados de hemoculturas. Neste estudo o KPC-2 foi detectado em 96,2% dos isolados e houve disseminação clonal inter-hospitalar e intra-hospitalar. (BARTOLLETTI et al., 2016). Este aumento tem sido atribuído principalmente à disseminação de isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2 (BRAUN et al., 2018), com esse patógeno se tornando o agente etiológico mais frequente de ICS relacionadas a cateter nas unidades de terapia intensiva brasileiras em 2016 (ANVISA, 2017).

Um estudo, realizado no Hospital Universitário de Londrina, avaliou 127 pacientes que desenvolveram infecções causadas por Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenêmicos, destes isolados 89,0% eram *K. pneumoniae*, o gene *bla_{KPC}* foi encontrado em 75,6% dos isolados e a resistência a colistina ocorreu em 21,3% dos isolados. A mortalidade por todas as causas foi de 61,4%. A mortalidade relacionada à infecção foi de 34,6% e a mortalidade em 30 dias foi de 28,3% (CARRILHO et al., 2016).

As polimixinas têm sido os antibióticos de escolha no tratamento de infecções graves por KPC-2, já que a maioria dos produtores de KPC é geralmente resistente a vários antimicrobianos, mas suscetível a esses agentes (MUNOZ-PRICE et al., 2013). No entanto, a escalada no consumo de polimixina tem sido associada ao surgimento de resistência à mesma entre isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2 (GIANI et al., 2015).

No Brasil, as taxas de resistência à polimixina B aumentaram significativamente, variando de 0 a 30,6% entre 2009 e 2015, como relata um estudo em isolados de *K. pneumoniae* proveniente de hemoculturas (BRAUN et al., 2018). Estudos anteriores também descreveram taxas crescentes de resistência à polimixina (23,0% a 49,7%) em isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase no Brasil (BARTOLLETTI et al., 2016) e em outras regiões geográficas (CAPONE et al., 2013; GIANI et al., 2015; SPYROPOULOU et al.,

2016). Outro estudo, documentou que 15,5% de *K. pneumoniae* isolados entre 2013 e 2014 eram resistentes à polimixina, nos hospitais brasileiros do Centro-Oeste. A análise genética demonstra que nesses hospitais a resistência à polimixina é de origem cromossômica, porque nenhum dos isolado de *K. pneumoniae* apresentou variantes do gene *mcr*. O principal mecanismo de resistência à polimixina em *K. pneumoniae* nos hospitais estudados foi devido a uma mutação no gene *pmrB* (RODRIGUES et al., 2019).

O surgimento e a disseminação de clones de *K. pneumoniae* resistente às polimixinas foram descritos (BRAUN et al., 2018; MAGIORAKOS et al., 2013; VARDAKAS et al., 2015), especialmente naqueles hospitais, onde o KPC-2 é endêmico (KONTOPIDOU et al., 2014; SPYROPOULOU et al., 2016). Na maioria dos casos, esses surtos estão associados a piores resultados e altas taxas de mortalidade (CAPONE et al., 2013; BRAUN et al., 2018). O aumento do consumo de polimixinas tem sido apontado como a principal razão para o surgimento e a disseminação de clones de *K. pneumoniae* resistente às polimixinas (GIANI et al., 2015).

O presente trabalho se justifica pelo crescimento da resistência desenvolvida pelas bactérias frente aos antimicrobianos disponíveis na prática clínica, esse tema ganhou tamanha importância ao ponto de se tornar um problema de saúde global. Em nosso trabalho pesquisamos as características moleculares e epidemiológicas de pacientes com infecções relacionadas a assistência à saúde, os quais desenvolveram ICS por *K. pneumoniae* com ou sem resistência aos β -lactâmicos, carbapenêmicos e polimixinas, em um hospital universitário, afim de expor variáveis de riscos que podem estar relacionados ao estado destes pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar as características epidemiológicas e moleculares de isolados de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de infecção na corrente sanguínea de pacientes do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU-UEL), de janeiro de 2015 a dezembro de 2018.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as características epidemiológicas dos pacientes que apresentaram infecção da corrente sanguínea por *K. pneumoniae*;
- Determinar a mortalidade secundária a infecção de corrente sanguínea por *K. pneumoniae*;
- Avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *K. pneumoniae*;
- Pesquisar por PCR a presença de genes de resistências aos β -lactâmicos e do gene de resistência às polimixinas *mcr-1*;
- Avaliar a diversidade genética dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* que apresentaram resistência aos carbapenêmicos e/ou às polimixinas, através da reação em cadeia da polimerase, baseada em sequências repetitivas intergênicas em Enterobacteriaceae (ERIC –PCR).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Este é um estudo transversal retrospectivo e descritivo de amostras de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes com ICS do HU-UEL, de janeiro de 2015 a dezembro de 2018. Após a positividade das hemoculturas de sangue periférico pelo aparelho Bactec™ (BD) foi realizada a semeadura em meios de cultura como, ágar sangue, ágar chocolate, ágar MacConkey e ágar cromogênico. A identificação foi realizada pelo sistema automatizado VITEK2® (bioMérieux) GN ID e o perfil de sensibilidade utilizando painel AST 239, a interpretação foi realizada de acordo com os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), de 2018. Após, os isolados foram estocados em ágar nutriente (temperatura ambiente) e em TSB (*Tryptic Soy Broth*) glicerinado a 15% (-20°C), até a realização deste estudo.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo isolados de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes com ICS, internados com mais de 48 horas de admissão no HU-UEL. Foi incluído no estudo somente um isolado por paciente, considerado proveniente de infecção segundo critérios de diagnóstico do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), (CDC, 2018).

Amostras de hemocultura via cateter positiva e pacientes cujo prontuário não foi localizado ou haviam muitas informações faltantes foram excluídas do estudo.

4.3 DADOS DOS PACIENTES

Foram coletados dados demográficos e laboratoriais de 107 pacientes com ICS por *K. pneumoniae*, incluindo idade, gênero, comorbidades, uso de antimicrobianos, entre outras informações dos prontuários, cedidos para consulta pelo Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) e do sistema informatizado Labhos (AGFA). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina CAAE 43013315.8.0000.5231, Anexo B.

4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

4.4.1 Microdiluição em Caldo

Preparo da droga: Foram preparadas soluções de (imipenem, meropenem, polimixina B e colistina) na concentração de 128 µg/mL, utilizando o medicamento em pó e água de injeção como diluente, com exceção do imipenem que foi diluído em *Phosphate Buffered Saline* (PBS) de acordo com as instruções do CLSI.

Preparo dos isolados: as amostras foram preparadas em escala de 0,5 de *McFarland* em NaCl (0,85%) estéril, em seguida 25 µL da amostra foi adicionada a um frasco de vidro estéril contendo 2475 µL de Caldo *Muller-Hinton* Cátion Ajustado (CAMHB).

Preparo das placas: Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços, a primeira coluna da microplaca foi preenchida com 100 µL do antimicrobiano testado, da segunda coluna até a última, foram adicionados aos poços 50 µL do meio de CAMHB, após todo preenchimento da placa, foi transferido 50 µL da primeira coluna para a segunda, homogeneizando três vezes, em seguida 50 µL da segunda coluna para a terceira e assim por diante, pulando a penúltima coluna que foi utilizada como controle de crescimento (CC), e desprezamos os 50 µL do conteúdo na última coluna, que foi o controle de esterilidade (CE).

Aplicação do inóculo: Foi adicionado 50 µL da amostra em cada poço na linha correspondente a mesma, com exceção do poço CE. Após adicionadas todas as amostras, a placa foi homogeneizada e incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24h. As ATCC, *E. coli* 25922 e *P. aeruginosa* 27853 foram utilizadas como controle do teste.

Interpretação de teste: A menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento do microrganismo, foi designada como CIM. Utilizamos os pontos de corte recomendados pela ANVISA, na Nota Técnica nº 01/2010, para avaliar a suscetibilidade (polimixina B e colistina: suscetível ≤ 2 µg/mL e resistente ≥ 4 µg/mL, imipenem e meropenem: suscetível ≤ 1 µg/mL, intermediário 2 µg/mL e resistente ≥ 4 µg/mL).

4.4.2 Carbapenemase Nordmann e Poirel (Carba NP)

O teste rápido foi realizado conforme descrito por Nordmann, *et al.* (2012),

segundo os autores o teste apresenta sensibilidade e especificidade de 99,9%. O teste foi realizado somente nas amostras que apresentaram resistência aos carbapenêmicos confirmada na microdiluição.

Preparo das Soluções: Foram preparadas as seguintes soluções, solução de Sulfato de Zinco 10mM (1,4g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) em 500 mL de água destilada); solução de Vermelho de Fenol 0,5% (1,25 g de vermelho de fenol em 250 mL de água destilada); solução de NaOH 0,1N (20mL de NaOH 1N em 180mL de água destilada).

Solução A: foi preparada adicionando 16,6 mL de água destilada, 2mL de solução de vermelho de fenol, 180 μ L de solução de Sulfato de Zinco. O pH foi ajustado para 7,8 com a solução de NaOH 0,1N e/ou HCL 10%.

Solução B: foi preparada com a adição de 18 mg de meropenem ou imipenem a 3 mL da solução A.

Preparo do teste: Foram identificados 2 eppendorf, A e B para cada isolado e controle, no tubo A foi adicionado 100 μ L da solução A, e no tubo B, 100 μ L da solução B. Com auxílio da alça descartável de 1 μ L, foi retirada da placa de cultura aproximadamente 1 μ L de colônias bacterianas e inseridas no tubo A e no tubo B, o tubo foi agitado por 5 segundos e incubado por 2h a 35 ± 2 °C.

Interpretação do teste: O teste foi considerado positivo quando o tubo B (teste) teve alteração da cor de vermelho para a cor laranja clara ou amarela indicando que houve a quebra da molécula de carbapenêmico pela enzima carbapenemase e conseqüentemente houve a produção de ácido, e o tubo A (controle) permaneceu vermelho ou alaranjado. Quando a solução se manteve da cor vermelha ou alaranjada em ambos os tubos (A e B) o teste foi considerado negativo.

4.4.3 Polimixina Nordmann e Poirel (Pol NP)

O teste rápido foi realizado conforme descrito por Poirel, *et al.* (2017) e apresenta sensibilidade e especificidade de 99,3% e 95,4% respectivamente, segundo os autores. Somente as amostras com resistência aos carbapenêmicos confirmada foram submetidas ao teste.

Solução NP: foi preparada com 225 mL de água destilada, 6,25 g de CAMHB e 0,0125 g de vermelho de fenol. O pH foi ajustado para 6,7. A solução foi

autoclavada a 121°C por 15 minutos, após foi adicionada 25 mL de solução de glicose a 10% e o volume foi corrigido para 250 mL com água destilada, a solução foi aquecida a 37°C antes do uso para evitar atraso no crescimento.

Solução de Polimixina B: o pó de sulfato de polimixina B foi diluído em meio CAMHB em tubo de vidro para obter uma concentração de 0,2 mg/mL.

Solução de NP com Polimixina B: foi preparada com a adição de 100 µL da Solução de Polimixina B em 4 mL de Solução de NP.

Preparo da bactéria: As colônias de bactérias foram dissolvidas em 3 mL de NaCL estéril (0,85%) ajustando a concentração entre 3,0 e 3,5, na escala de *McFarland*.

Preparo do teste: em uma microplaca de 96 poços, para cada amostra foram adicionados em paralelo dois poços um com 150 µL de solução NP com polimixina B e outro com 150 µL de solução NP sem polimixina B, em ambos foi adicionada 50 µL da suspensão bacteriana, foi feito um controle negativo (solução NP sem polimixina B) e utilizamos amostras com resultados já confirmados como controle positivo. A leitura dos resultados foi realizada após 2 e 4 horas de incubação da microplaca a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Interpretação do teste: o resultado foi considerado positivo quando foi observada uma mudança na coloração da solução de laranja para amarelo, indicando que houve o consumo de glicose do meio e crescimento bacteriano na presença da polimixina. Quando a solução se manteve laranja, o teste foi considerado negativo, quando não há crescimento bacteriano na presença de polimixina.

4.5 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA foi extraído pelo Kit *PureLink Genomic* (Invitrogen), as amostras foram crescidas em caldo TSB $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas e após crescimento 1mL desta suspensão foi centrifugada (10.000 rpm por 5 min.), o sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspendido com 180 µL de *PureLink Genomic Digestion Buffer* mais 20 µL de *Proteinase K* e incubado a 55°C por 2 horas, após 20 µL de *RNase* foram adicionados, homogeneizados e incubados por 2 min. a temperatura ambiente (TA), então 200 µL de *PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer*, foram adicionados e homogeneizados, após 200 µL de etanol 96 – 100% foram adicionados,

homogeneizados e transferidos para um tubo com coluna (*PureLink Genomic Spin Columns*) e centrifugados (13.000 rpm por 2 min.), a coluna foi transferida para um tubo novo, 500 µL de *Wash Buffer 1* foram adicionado na coluna e centrifugado (13.000 por 2 min.), a coluna foi transferida para um tubo novo, 500 µL de *Wash Buffer 2* foi adicionado na coluna e centrifugado (15.000 por 4 min.), a coluna foi transferida para um eppendorf de 1,5 mL, foi adicionado 50 µL de *PureLink Genomic Elution Buffer* e incubada por 1 min. a TA, após foi centrifugada (15.000 rpm por 2 min.), a colula foi descartada e o DNA purificado foi guardado (-20°C).

4.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As amostras que apresentaram o teste fenotípico positivo para carbapenemases foram caracterizadas genotipicamente por PCR, para os seguintes genes, *bla_{KPC}*, *bla_{SPM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, e *mcr-1*. As reações foram submetidas a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto com exceção do *MCR-1* que a temperatura de hibridização foi de 56°C e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Foi utilizado o *TopTaq® Master Mix Kit* (QIAGEN®), para algumas amostras que apresentaram presença de bandas inespecíficas e para os genes *bla_{OXA-48}*, e *MCR-1*. Os *primers* utilizados estão detalhados na tabela 1.

Para as mesmas amostras foi realizada a PCR, baseada em sequências repetidas intergênicas em Enterobacteriaceae (ERIC-PCR), a reação realizada como descrito por Versalovic (1991). As reações de amplificação foram executadas para o volume final de 25 µL com tampão de PCR 1X, dNTP, Taq DNA Polimerase Recombinante Brasileira. As reações foram incubadas à 95°C por 1 minuto e em seguida 45 ciclos a 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto, 72°C por 7 minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos. Os primers utilizados estão descritos na tabela 1 e foram utilizados em uma concentração de 50pmol.

4.7 ELETROFORESE

Os produtos da reação de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,0% em solução de Tris/Borato/EDTA (TBE) 1x. Na aplicação no gel de agarose foram adicionados 4 µL de tampão de amostra e 6 µL de amostra. A eletroforese foi

realizada a 80 volts, por 40 minutos. O marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. Após a corrida o gel foi adicionado à solução de brometo de etídio (0,08 µL/100 mL) por 15 minutos e visualizado em luz ultravioleta (UV).

O produto da amplificação do ERIC-PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com tampão TBE. O aparelho foi ajustado para 100 v e 400 mA, por 210 minutos. A análise foi realizada pela coloração do gel com brometo de etídio (0,5 µg/mL), visualização em luz UV.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram demonstrados em média ou mediana para as variáveis contínuas ou através da frequência e percentual, foram comparadas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon e as variáveis categóricas pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher quando apropriado, foi realizada regressão (stepwise) para as amostras que demonstraram significância estatística na análise bivariada. O nível de significância adotado para comparação das variáveis nos testes foi o p valor < 0.05 . Foi utilizado o sistema *Statistical Package for Social Science* (SPSS – IBM Corp., Nova York, EUA), versão 20.0 para Windows.

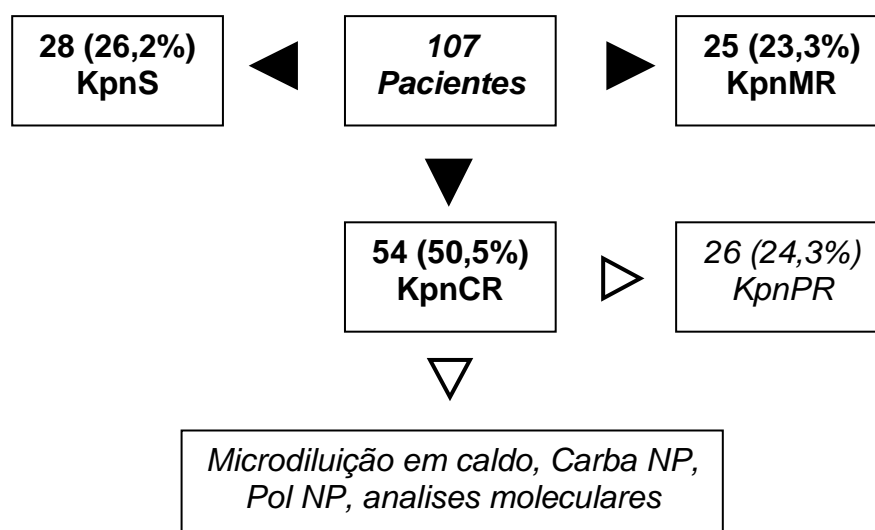


Figura 1. Fluxo dos testes realizados e classificação da resistência dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* de 107 pacientes com infecção da corrente sanguínea. KpnS (*K. pneumoniae* sensível aos β -lactâmicos); KpnMR (*K. pneumoniae* resistente aos β -lactâmicos de amplo espectro); KpnCR (*K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos) e KpnPR (*K. pneumoniae* resistente às polimixinas).

Tabela 1 - Genes codificadores das enzimas *bla*_{GIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{SPM}, *bla*_{VIM}, *MCR-1* e *ERIC*, sequência dos oligonucleotídeo, tamanho do fragmento amplificado e referências.

Enzima	Gene	Sequências (5' – 3') F/R	Pb	Referências
GIM	<i>bla</i> _{GIM}	TCGACACACCTTGGTCTGAA AACTTCCAACCTTTGCCATGC	172	Ellington <i>et al.</i> , (2007)
IMP	<i>bla</i> _{IMP}	GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC CCAAACYACTASGTTATCT	587	Ellington <i>et al.</i> , (2007)
KPC	<i>bla</i> _{KPC}	ATGTCACTGTATCGCCGTCT TTTTTCAGAGCCTTACTGCCC	538	Bradford <i>et al.</i> , (2004)
NDM	<i>bla</i> _{NDM}	GCAGCTTGTCCGCCATGCGGGC GGTCGCGAAGCTGAGCACCCGCAT	782	Doyle <i>et al.</i> , (2012)
OXA-48	<i>bla</i> _{OXA-48}	GCTTGATCGCCCTCGATT GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	281	Poirel <i>et al.</i> , (2004)
SPM	<i>bla</i> _{SPM}	AAAATCTGGGTACGCAAACG ACATTATCCGCTGGAACAGG	569	Ellington <i>et al.</i> , (2007)
VIM	<i>bla</i> _{VIM}	GATGGTGTGGTTCGCAT CGAATGCGCAGCACCAG	389	Ellington <i>et al.</i> , (2007)
MCR	<i>mcr-1</i>	CGGTCAGTCCGTTTGTTC CTTGGTCCGTCTGTAGGG	350	Liu <i>et al.</i> (2016)
ERIC		AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG CACTTAGGGGTCCCTCGAATGTA		Versalovic <i>et al.</i> , (1991)

Fonte: o próprio autor.

5. RESULTADOS

Os resultados deste estudo estão apresentados no seguinte artigo:

High mortality from carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection

Abstracts

In this study, it was evaluated clinical data of 107 patients with bloodstream infection (BSI) by *K. pneumoniae* and performed phenotypic and molecular analyzes in 50.5% (54/107) of the samples, those that showed a resistance profile to carbapenemics and/or polymyxins. The *bla_{KPC}* gene was present in 90.4% (49/54) of the samples, *bla_{NDM}* gene in one sample and, in 7.4% (4/54) of the samples, no carbapenemase gene was found. In the similarity analysis, it was found 4 main clones and 11 samples were not genetically related. The median age of the patients was 58 (40-70) years old and 60.7% (65/107) were male. When comparing two groups of patients with BSI due to *K. pneumoniae* with and without resistance to carbapenems, the variables ICU permanence, renal failure (IR), previous use of antimicrobials, Charlson's comorbidity index (ICCi), some invasive procedures and death showed a statistically significant difference ($p < 0.05$). And when relating death as a dependent variable, IR, liver failure and patients with BSI XDR or PDR, were predictors of increased mortality. Our study showed a higher mortality rate in patients with BSI due to carbapenem-resistant pneumonia with additional resistance or not to polymyxins.

Key word: *Klebsiella pneumoniae*; Antimicrobial Resistance; Carbapenems; Polymyxins.

Introduction

Antibiotic resistance is rising to dangerously high levels in all parts of the world. New resistance mechanisms are emerging and spreading globally, threatening our ability to treat common infectious diseases (WHO, 2018). *Klebsiella* species are considered opportunistic pathogens, widely found in the mouth, skin and intestines, as well as in hospital settings and medical devices (LI et al., 2014). However, they

can spread to other tissues causing potentially fatal infections, including pneumonia, urinary tract infections, bloodstream infections (BSI) and sepsis (BENGOECHEA; SA PESSOA, 2019; HENNEQUIN; ROBIN, 2016; LEE et al., 2017; PACZOSA, 2016).

Resistance to several β -lactam antibiotics was first found in *K. pneumoniae* in 1983 and this resistance was derived from the production of extended spectrum β -lactamases (ESBL). The prevalence of ESBL-producing *K. pneumoniae* has increased and this has made it difficult to effectively manage these infections (AH; KIM; LEE, 2014). With the emergence of ESBL-producing microorganisms, carbapenem antimicrobials have been used more often to treat these infections. However, due to the selective pressure developed by these antimicrobials, resistance indices to these drugs have increased in several microorganisms (BARAN; AKSU, 2016; ESPOSITO et al., 2017; YOUSFI et al., 2019).

Due to the emergence of carbapenem-resistant microorganisms, as well as the lack of new antimicrobials against Gram-negative pathogens, the use of old antibiotics to treat these infections has been reconsidered. In this context, the use of polymyxins has resurfaced in the therapeutic arsenal (BARAN; AKSU, 2016; GIAMARELLOU, 2016; JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017). The emergence of strains resistant to polymyxin, considered as a “last resource” for the treatment of patients with infection by extremely resistant microorganisms, is becoming a critical issue in a growing number of countries (JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017).

An alarming increase in the prevalence of carbapenem resistance in *K. pneumoniae* blood cultures has been demonstrated, with a large proportion of *K. pneumoniae* demonstrating additional resistance to colistin and presenting a significant unprecedented therapeutic challenge with an unacceptably higher prevalence (BALKHAIR et al., 2019).

In literature, the reported mortality rate of BSI due to multi-resistant *K. pneumoniae* varies in most studies from 15 to 79% (DURDU et al., 2016; FRAENKEL-WANDEL et al., 2016; XU et al., 2018). Obviously, a therapeutic failure will show more often the broader the resistance profile applied in BSI, as empirical therapy with an active antimicrobial is unlikely in cases of extensive drug resistance (ZHANG et al., 2018). Given a variety of mechanisms associated with resistance, inexperience of clinicians regarding the use of polymyxins and the severity of clinical conditions, mortality may be significantly higher for BSI by isolates resistant for carbapenem and polymyxin (GIACOBBE et al., 2015; ROJAS et al., 2016;

TUMBARELLO et al., 2015).

A number of comparative studies demonstrate the participation of antimicrobial resistance as an important risk factor for poor outcome in the patients with BSI caused by *K. pneumoniae* in the hospital environment (XIAO et al., 2018; XU; SUN; MA, 2017). Therefore, rapid detection associated with the implementation of effective infection control measures are extremely important to prevent the dissemination of polymyxin resistant *K. pneumoniae* (BRAUN et al., 2018). It is also clear that infections with resistant *K. pneumoniae* are associated with higher mortality rates. Although this association is multifactorial, delayed appropriate therapy is an important contributor to this increased likelihood of death from these infections (SHLAES, 2019).

In this context, the objective of this study was to evaluate the risk factors, mortality and molecularly characterize carbapenemases producing *K. pneumoniae* of isolates causing BSI in a tertiary hospital in southern Brazil.

Materials and Methods

Bacterial strain selection

Patients hospitalized from January 2015 to December 2018 who presented BSI by *K. pneumoniae* were included in this study. Clinical data were assessed for all these patients. Samples that showed resistance to carbapenems and / or polymyxins were carried out for phenotypic and genotypic characterization. The Inclusion criteria was BSI for *K. pneumoniae* of patients with more than 48 hours of hospitalization, as described in the CDC criteria (CDC, 2018). Whereas, the exclusion criteria were catheter-related BSI isolates and those whose medical records had incomplete information. The isolates were stored on nutrient agar (room temperature) and TSB (Tryptic Soy Broth) glycerin at 15% (-20°C) until this study was carried out.

Clinical and laboratory data

Demographic and laboratory data were collected from patients with *K. pneumoniae* BSI, including age, gender, comorbidities, previous use of antibiotics, Charlson's comorbidity index and other information from physical records provided for consultation by Medical and Statistical Archive Service, and the Labhos Computerized System (AGFA). The study was approved by the Research Ethics Committee of the State University of Londrina CAAE 43013315.8.0000.5231.

Antibiotic susceptibility testing

The samples were identified with VITEK® 2 GN ID card and the susceptibility profile with AST 239 (bioMérieux, USA), as described in Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). The Minimum inhibitory concentration (MIC) by imipenem, meropenem, colistin and polymyxin B were determined by broth microdilution (BMD). The bacterial suspensions were adjusted according to CLSI recommendations, and *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *E. coli* ATCC 25922 were used as quality control. The isolates were classified as multidrug-resistant (MDR), extensively-drug-resistant (XDR), or pandrug-resistant (PDR) (MAGIORAKOS et al., 2013).

Phenotypic testing

The isolates were screened for carbapenemase production by the rapid test Carbapenemase Nordmann and Poirel (Carba NP) (NORDMANN; POIREL; DORTET, 2012) and the resistance to polymyxin were evaluated with the Polymyxin Nordmann and Poirel (Pol NP) (POIREL; NORDMANN; UNIT, 2015) rapid test.

Molecular analysis

The research to evaluate the presence of carbapenemases was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR) to *bla_{KPC}* gene (BRADFORD et al., 2004), MBL genes (IMP; VIM; GIM; and SPM) (ELLINGTON et al., 2007), NDM (DOYLE et al., 2012), *mcr-1* gene (LIU et al., 2016) and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991). The products were stained by ethidium bromide (Invitrogen, Carlsbad, USA) and observed under UV light. The sizes of the fragments were first normalized according to the molecular weight of the DNA markers, and then the fingerprints were analyzed using BioNumerics software (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, version 4.6), with a position tolerance of 2%. The samples were submitted to similarity analyses using the UPGMA algorithm (unweighted pair-group method, with arithmetic) with the Dice coefficient. DNA fragments greater than 12,000 bp or smaller than 200 bp were excluded from the analysis.

Statistical analysis

Data were compared by non-parametric Wilcoxon test and categorical variables by Chi-square or Exact Fisher when appropriated. The samples that showed a statistical difference in the binary test were submitted to logistic regression (Stepwise). The significance level was p value < 0.05 . Statistical Package for Social Sciences (SPSS - IBM Corp., New York, USA) version 20 for Windows was used.

Results

In the studied period, we analyzed data from 107 patients with *K. pneumoniae* BSI. The group Kpn non-CR was formed by the patients who presented BSI by *K. pneumoniae* that showed sensitivity to β -lactam broad spectrum (KpnS) as 28 (26.2%) of the isolates and 25 (23.3%) ESBL producers (KpnMR). The Kpn CR group was composed of patients who had BSI by *K. pneumoniae* resistant to carbapenems as 54 (50.5%) (KpnCR) and 24.3% (26/54) additional resistance to polymyxins (KpnPR).

Carba NP test was positive for 92.6% (50/54) of the isolates and 7.4% (4/54) were negative. For Pol NP test, 48.1% (26/54) of the isolates were positive, which confirmed the resistance to polymyxins in the same samples where the resistance was detected by microdilution method. The results of microdilution testing for imipenem, meropenem, polymyxin and colistin for de 54 isolates are shown in Figure 1.

Of the 107 strains in the present study, automatized test presented the following resistance profile: colistin 24.3%, meropenem 50.5%, imipenem 49.5%, ertapenem 50.5%, ceftazidime 64.5%, cefepime 63.6%, ciprofloxacin 61.7%, sulfamethoxazole and trimethoprim 62.6%, piperacillin and tazobactam 57.0%, tigecycline 21.5%, with 37.4% presented intermediate profile for tigecycline, 51.4% gentamicin and 26.2% amikacin. Of the 54 carbapenem resistant isolates, 24.1% (13/54) were PDR and 75.9% (41/54) were XDR; their respective susceptibility profiles can be seen in Figure 1.

PCR results showed that 90.7% (49/54) of isolates carried the *bla_{KPC}* gene, only one carried *bla_{NDM}* and 7.4% (4/54) of the isolates presented no carbapenemases genes tested.

In the similarity analysis, most samples showed similarity greater than 85%, with the presence of 4 groups. Clone A was formed with 8 isolates, all with additional

resistance to polymyxins. All isolates of this clone were between the years 2017 and 2018 and with 2 samples (24 and 30) showing to be genetically identical. In clone B, all isolates were resistant to polymyxins and were isolated between the years 2015 and 2016, and only one in 2017. This clone has two genetically identical samples (7 and 8). The clone C was formed with 10 isolates from samples between 2017 and 2018, with only one from 2015, and two of them (64 and 66) with 100% genetic similarity. The major clone D presented 15 samples isolated between 2015 and 2018. of those, 11 samples were not genetically related but 2 pairs were genetically identical and most isolates were from 2018.

For data analysis, we used all 107 patients of the study and divided into a Kpn non-CR group and a Kpn CR group. According to the data collected, the median age was 58 years old (40 – 70) and there was no statistical difference in relation to age between groups ($p = 0.138$). 65 (60.7%) were male and there was also no statistical difference between the groups regarding gender ($p = 0.132$).

Among patients who spent more than 24 hours in the ICU, their stay in this unit increased the chance to acquire BSI by *K. pneumoniae* XDR in almost 4 times more. The most prevalent comorbidity was renal failure (IR), and these patients were more likely to develop BSI due to *K. pneumoniae* XDR. The others comorbidities analyzed showed no statistical difference (Table 1).

The previous use of carbapenems and polymyxins, in the 14 days prior to infection, showed that 31.8% and 24.3%, respectively, of the patients used antimicrobials before they presented BSI, increasing the chance of having BSI by *K. pneumoniae* XDR. The mean age-corrected Charlson's comorbidity index (ICCi) in group one was 3.5 ± 3.3 (corresponding to an estimated 65% survival rate over 10 years), while in the second group this average was 6.3 ± 3.6 (survival of 1.9% in 10 years). Therefore, patients with BSI due to *K. pneumoniae* XDR have lower survival (Table 1).

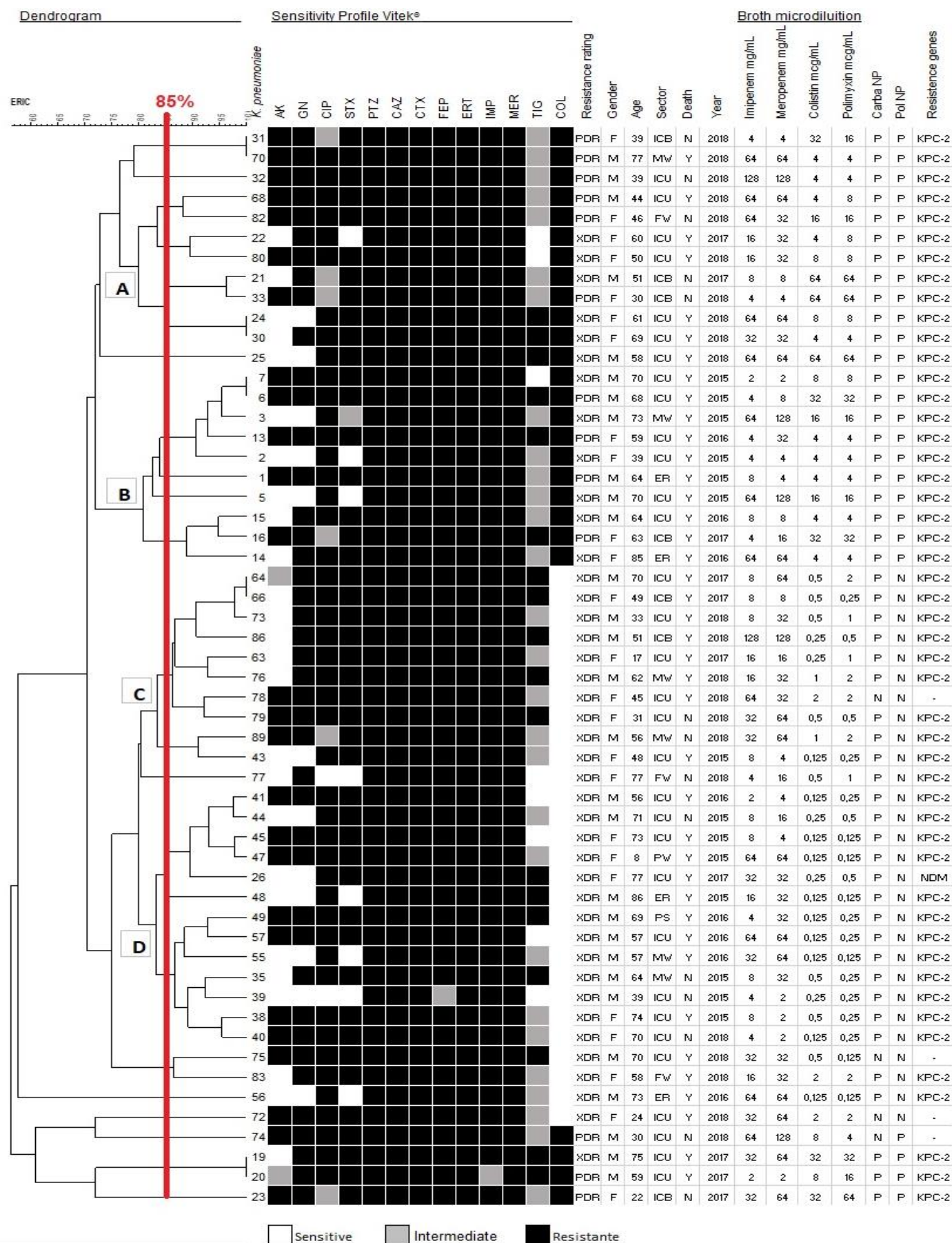


Figure 1. Dendrogram of 54 *K. pneumoniae* isolates, determinants and antimicrobial sensitivity profile. Amikacin (AK), gentamicin (GN), ciprofloxacin (CIP), sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT), piperacillin-tazobactam (PTZ), ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX), cefepime (FEP), ertapenem (ERT), imipenem (IMP), meropenem (MEM), tigecycline (TIG), colistin (COL). Gender: Feminine (F), Male (M). Sector: Emergency Room (ER), Female Ward (FW), Intensive Care Unit (ICU), Intensive Care Unit Burned (ICB), Male Ward (MW), Pediatric Ward (PW). Death: No (N), Yes (Y). Carba NP and Pol NP: Negative (N), Positive (P).

During the hospitalization period, the patients underwent invasive procedures. When analyzing the procedures preceding the infection, a statistically significant difference was found when comparing the groups for the following procedures: central venous catheter (CVC), mechanical ventilation (VM) and Hemodialysis (HD). The other procedures showed no statistical difference.

Of the 107 patients studied, 56.1% (60) died and when comparing the groups, patients with carbapenem and/or polymyxins resistance were more likely to die. In clone B all patients progressed to death.

Table 1. Demographic characteristics, mortality and variable assessed in patients of the HU-UEL with infection of the bloodstream by *Klebsiella pneumoniae*, between 2015 and 2018.

	Kpn non-CR N = 53 (%)	Kpn CR N = 54 (%)	P value	Odds Ratio (95% CI)
Stay in UCI	21 (39.6)	39 (72.2)	0.001	3.9 (1.8-8.9)
<i>Comorbidities</i>				
Diabetes Mellitus (DM)	10 (18.6)	10 (18.5)	0.963	
Renal insufficiency (IR)	13 (24.5)	29 (53.7)	0.002	3.6 (1.6-8.1)
Liver failure (IH)	11 (20.8)	15 (27.7)	0.397	
Congestive heart failure (ICC)	6 (11.3)	5 (9.3)	0.761	
Chronic obstructive pulmonary disease (DPOC)	5 (9.4)	10 (18.5)	0.265	
Stroke (AVC)	6 (11.3)	6 (11.1)	0.973	
Neoplasia	8 (15.1)	5 (9.3)	0.391	
Ulcer	0 (0)	2 (3.7)	0.495	
Hemiplegia	3 (5.7)	1 (1.9)	0.363	
Acute myocardial infarction (IAM)	4 (7.5)	2 (3.7)	0.437	
Charlson Comorbidity Index ICCi (mean ± SD)	3.5 ± 3.3	6.3 ± 3.6	<0.001	
<i>Invasive procedures</i>				
Central venous catheter (CVC)	20 (37.7)	36 (66.7)	0.003	3.3 (1.5-7.3)
Mechanical ventilation (VM)	19 (35.8)	36 (66.7)	0.001	3.6 (1.6-7.9)
Hemodialysis (HD)	7 (13.2)	21 (38.9)	0.003	4.2 (1.6-10.9)
Urinary delayed catheter (SVD)	24 (45.1)	22 (40.7)	0.635	
Surgery	22 (41.5)	32 (59.3)	0.066	
<i>Antimicrobials 14 days before</i>				
Polymyxins	3 (5.6)	23 (42.6)	<0.001	7.7 (2.3-25.5)
Carbapenemics	5 (9.4)	29 (53.7)	<0.001	11.1 (3.8-32.3)
<i>Mortality</i>	20 (37.7)	40 (74.1)	<0.001	4.7 (2.1-10.8)

The Group Kpn non-CR was formed by 28 KpnS and 25 KpnMR and the group Kpn CR was formed by 28 KpnCR and 26 KpnPR.

In order to outline the best clinical predictors for the outcome and verify the association between carbapenem resistance and different outcomes, we performed automatic stepwise logistic regression analyzes, as follows: model 1: groups with and without carbapenem resistance, without the variable previous use of antimicrobials, model 2: the two groups with the variable previous use of antimicrobials. In addition, in the third and last model, variables independently associated with in-hospital death were assessed as a dependent variable. Only variables that showed a statistical difference ($p < 0.005$) in binary regression were added to this analysis (Table 2).

In the first model, the results show that ICU stay and ICCi were significant predictors of BSI by more resistant microorganisms, together, these two variables could correctly classify 69.2% of all cases, with a sensitivity of 69.8% and specificity of 68.5%. In the second model, the results that proved to be significant predictors were: ICCi, previous use of carbapenems and previous use of polymyxins, when 78.5% of cases were correctly classified with sensitivity of 84.9% and specificity of 72.2%, we can observe that when the previous use of antimicrobials was added, the ICU stay did not enter the forecast model.

In addition, when death was assessed, the presence of IR, IH and the presence of XDR or PDR infection were predictors of hospital mortality, with ability to correctly classify 72.9% of cases, with a sensitivity of 55.3% and specificity of 86.7%.

Table 2. Results of stepwise logistic regression with groups with and without antimicrobial resistance and death as dependent variables.

Dependent variable	Explanatory variables	β (EP)	Wald	P value	OR (95% CI)
Carbapenemics resistance	Stay ICU	1.60 (0.47)	11.75	0.001	4.97 (1.98-12.91)
	ICCi	0.26 (0.06)	14.66	<0.001	1.29 (1.13-1.48)
Carbapenem Resistance	Mechanical ventilation	1.07 (0.51)	4.39	0.036	2.91 (1.07-7.87)
	ICCi	0.20 (0.08)	6.89	0.009	1.23 (1.05-1.43)
	Previous use – carbapenems	1.51 (0.62)	5.84	0.016	4.52 (1.33-15.35)
	Previous use - polymyxins	1.94 (0.81)	5.71	0.017	6.97 (1.42-34.25)
Death	Renal insufficiency	1.44 (0.51)	8.11	0.004	4.24 (1.57-11.45)
	Liver failure	1.73 (0.64)	7.28	0.007	5.64 (1.61-19.87)
	Carbapenemics Resistance	1.34 (0.47)	8.09	0.004	3.82 (1.52-9.64)

To analyze the relationship between the different levels of antimicrobials resistance present in the work with patients who evolving to death, multivariate regression was applied, the KpnPR group was the reference group, when compared to the KpnS group ($p = 0.007$, OR: 0.21; 95% CI: 0.06-0.65), so sensitivity is a protective factor for non-evolution to death, in relation to the KpnMR group ($p = 0.02$; OR: 0.25; 95% CI: 0.08-0.80), being also a protective factor when compared to the KpnPR group, while the KpnCR group did not show statistical difference when compared to the KpnPR group ($p = 0.872$; OR: 1.11; 95% CI: 0.33-3.38).

Discussion

In recent years, resistance to antimicrobials in microorganisms is a global health problem, seen as a threat to public health, predicted to attack 10 million deaths worldwide by the year 2050 (BAND et al., 2018; JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017). Among the most significant problems of antimicrobial resistance are carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, including *K. pneumoniae*, which lead to high rates of morbidity and mortality (AH; KIM; LEE, 2014). The increasing prevalence of antimicrobial resistance is a global concern, but in general, Brazil and Latin American countries show higher levels of bacterial resistance among most of its main pathogens, when compared to Europe and the United States (ROSSI et al., 2017).

With the emergence of ESBLs, carbapenem antimicrobials have been used more frequently for the treatment of these infections, but due to the selective pressure due to the use of carbapenems, increasing rates of resistance to these drugs have been observed in a variety of microorganisms, including *K. pneumoniae*, which is constantly increasing in clinical settings (BARAN; AKSU, 2016; ESPOSITO et al., 2017; YOUSFI et al., 2019). In our study, the *bla*_{KPC} gene was the most frequently gene, found in 90.7% (49/54) of the isolates, and one *bla*_{NDM} was detected. KPC strains have increased worldwide due to the rapid spread of host-wide conjugative plasmids. Since 2010, in our hospital, the therapeutic failure has been constant for infections by *K. pneumoniae*, which has a high prevalence of KPC carbapenemase producers and a strong relationship with high mortality rates (CARRILHO et al., 2016). This same study shows that the *mcr-1* gene was not found, indicating that colistin resistance is more likely due to selective pressure by colistin

use rather than a plasmid or clonal propagation among our isolates. In another study of 825 KpnCR isolates that were analyzed, NDM gene was found in 0.38% (4/825), *bla*_{VIM} in 0.72% (6/825) and *bla*_{OXA} in 0.72% (6/825) (NAVA et al., 2019). In our study, carbapenemases were more frequently investigated, but still four isolates of *K. pneumoniae* were negative suggesting the involvement of other resistance mechanisms. Carbapenems resistance may involve multiple mechanisms, such as carbapenemase production (KPC, NDM, OXA and M β L) alone or in combination with loss of porins (DOUMITH et al., 2009), ESBL (TEM, SHV, CTX- M) and/or AmpC enzymes associated with porin loss and the presence of efflux pumps (QUEENAN; BUSH, 2007).

In the genetic variability analysis, the most of isolates presented 85% similarity. Studies have shown that few bacterial clones are responsible for the worldwide spread of important resistance genes (CASTANHEIRA et al., 2012).

In this study, *K. pneumoniae* isolates showed high frequency of resistance to carbapenems and colistin and we observed an increase in the resistance rates for tigecycline when compared to a previous study (CODJOE; DONKOR, 2017). A high level of resistance to different antimicrobial classes has frequently been observed in KPC-producing isolates worldwide. Resistance to polymyxin and tigecycline is very worrisome, because these antimicrobials have been the last option for treatment of severe infections caused by KPC-producing microorganisms (ADEOLU et al., 2016). In private and public tertiary hospitals located in Brazil, also was reported a low susceptibility rates for amikacin (41.4%) and gentamicin (29.6%) (SAMPAIO; GALES, 2016).

Some authors explain that the antibiotic resistance is the evolutionary response to the strong selective pressure that results from exposure to these compounds (VAN DUIN; PATERSON, 2016; WRIGHT, 2010). In a study with 46 KPC-producing *K. pneumoniae*, some isolates have false sensitivity by the automated Vitek 2[®] system2 (BULIK et al., 2010). However, another study showed that the susceptibility to meropenem by the Vitek2[®] automated system was similar in the 40 *Enterobacter* spp. Therefore, no false sensitivity was observed related to the automated method (RECHENCHOSKI et al., 2017). The false sensitivity detection rate should be less than 1,5% of the isolates as recommended in CLSI (2018). In our study no false sensitivities were found, all results were in agreement between the automated system and the MIC.

In 2012, Magiorakos and colleagues defined as MDR those isolates that have acquired non-susceptibility to at least one agent in three or more antimicrobial categories; XDR isolates have acquired non-susceptibility to at least one or two agents in all antimicrobial categories and PDR isolates have acquired non-susceptibility to all agents in all antimicrobial categories. Available evidence suggests that the expanded and inadequate use of polymyxins in clinical practice has led inexorably to the worldwide emergence of polymyxin-resistant bacteria, leaving physicians unprepared to treat pan-drug resistant patients (PDR) (MAGIORAKOS et al., 2013; SRINIVAS; RIVARD, 2017). In our study, high rate of XDR and PDR samples were found.

The median age of our patients was 58 years old and 60.7% were male. In confirmation of our data, virtually all of the studies published in the literature focus primarily on patients with systemic *K. pneumoniae* infections and those on the male gender, with an average age close to 60 years old (DURDU et al., 2016; TIAN et al., 2018).

In two statistical analyzes we saw that the ICU admission increases the chances of carbapenem-resistant infections, however, when analyzed in stepwise regression with the addition of previous use of antimicrobials, this variable is no longer significant. Also, in a study that analyzed the factors for fecal carriage of carbapenemase producing Enterobacteriaceae among intensive care unit patients from tertiary care center in India, the authors conclude that the exposure to UCI further increases risk of colonization with diverse carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (MITTAL et al., 2016).

Of all comorbidities analyzed in the study, patients with IR presented a higher odd of developing resistance. This result is expected because polymyxins are intensively or long-administered to these patients, and sometimes with subdosis. When we analyzed patients, who died as a dependent variable on IR, it was also a risk factor as well as IH. Comorbidities and their correlation with mortality are very variable in several studies (TIAN et al., 2018; TUMBARELLO et al., 2015), and it was not possible to establish a consistent correlation for others clinical conditions analyzed.

In this study, patients who had BSI by *K. pneumoniae* resistant to carbapenems that made prior use of carbapenemics and/or polymyxins, increased the chances of developing infection resistance. Carbapenemics administration is well

established in the literature as a crucial risk factor for the development of infections with this therapeutic limitation, reported as a predictor of mortality in ICU (ROJAS et al., 2016; TIAN et al., 2018). Such results could mitigate the responsibility of carbapenemics as villains for the high prevalence of XDR and PDR isolates in the hospital. However, studies show the participation of different antimicrobials in the selection of multiresistant *K. pneumoniae* and, consequently, as risk factors for severe infections (CARRILHO et al., 2016; GIACOBBE et al., 2015; XU et al., 2018). Other factors could also be contributing to the high rates of resistance and mortality, such as ineffective or late antimicrobial therapy for BSI during the study period.

The ICCi consists of observing secondary diagnoses in order to assign weight of comorbidity to an additional risk of death of the patient and additionally corrected with 1 point for each decade of life from 50 years (CARRILHO, 2014). For Tumbarello et al. (2015), ICCi>3 was found in 53.9% of patients. In our study, 61 (57.0%) patients had ICCi>3 and patients with non-carbapenem-resistant infection presented a mean of 3.5 ± 3.3 , while the carbapenem resistant group presented a mean 6.3 ± 3.6 , ($p < 0.001$), therefore patients with infection by more resistant microorganisms have a shorter survival and in stepwise regression we saw that patients with higher ICCi are more likely to develop resistance to carbapenemics. Thus, many authors conclude the high mortality data, much higher than that reported in the literature, induces us to reevaluate processes and to investigate further the patient-microorganism relationship, which goes through the patient's predisposing conditions, clinical and therapeutic management and also by characteristics, of virulence and/or clonality of isolates (DURDU et al., 2016; XU et al., 2018).

The increased mortality of infections caused by *K. pneumoniae* has been drawing attention, especially due to the prevalence of isolates with broad antimicrobial resistance in hospitals and the dispersion of hypervirulent strains (TIAN et al., 2018). In this study, 56.1% (60/107) of the patients in our study evolved to death and patients with KpnCR and/or KpnPR were more likely to die (74.1%). When we analyzed death from all causes as a dependent variable, we observed that IR and IH are factors that were related to the mortality increase of our patients. We also observed that patients with BSI due to KpnCR and PR have more chances evolving to death. And when comparing mortality between groups of patients, patients with BSI by KpnCR and PR showed no statistical difference. In a meta-analysis, mean patient mortality from 22 studies with non-KpnCR infection was 21.1%, but in the 67

KpnCR studies, mortality was significantly higher, with a mean of 42.1%, comparative data demonstrated in twenty studies with KpnCR BSI, this rate ranged from 47.5% to 61.0% (TUMBARELLO et al., 2015).

During the hospitalization period, the patients underwent invasive procedures. When analyzing the procedures preceding the infection, a statistically significant difference was found when comparing the groups for the following procedures: CVC, VM and HD. However, only the VM showed a statistically significant difference in stepwise regression. For decades, mechanical ventilation-associated pneumonia has been studied, considered in many institutions as the most frequent care-related infection, as a window for the invasion of multidrug-resistant infectious agents and as a determinant factor for morbidity (KEYT; FAVERIO; RESTREPO, 2014), huts as VM, other invasive procedures, are entry points for infection by such microorganisms.

The results show that the ICS caused by *K. pneumoniae* is due to complex clinical conditions complicated by multiple previous comorbidities and invasive hospital procedures. The increased resistance of isolates to antimicrobials is associated with high mortality rates related to healthcare-related infections. Our results show a prevalence of XDR and PDR isolates. The production of the KPC gene was the most frequent resistance mechanism found. The clinical isolates studied showed high genetic similarity, showing that there may be two strains of KpnCR predominant in HU-UEL.

Acknowledgment

All employees and Dr. Eliana Carolina Vespero.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- ADEOLU, M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5575–5599, 2016.
- AH, Y. M.; KIM, A. J.; LEE, J. Y. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 1, p. 8–15, 2014.
- BALKHAIR, A. et al. Prevalence and 30-day all-cause mortality of carbapenem-and

- colistin-resistant bacteraemia caused by *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*: Description of a decade-long trend. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 85, p. 10–15, 2019.
- BAND, V. I. et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* exhibiting clinically undetected colistin heteroresistance leads to treatment failure in a murine model of infection. **mBio**, v. 9, n. 2, p. 1–6, 2018.
- BARAN, I.; AKSU, N. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level reference hospital in Turkey. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2016.
- BENGOECHEA, J. A.; SA PESSOA, J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: Living to counteract host defences. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 2, p. 123–144, 2019.
- BRADFORD, P. A. et al. Emergence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella* Species Possessing the Class A Carbapenem-Hydrolyzing KPC-2 and Inhibitor-Resistant TEM-30 β -Lactamases in New York City. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 1, p. 55–60, 2004.
- BRAUN, G. et al. Temporal evolution of polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones recovered from blood cultures in a teaching hospital during a 7-year period. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 3, p. 522–527, 2018.
- BULIK, C. C. et al. Comparison of meropenem MICs and susceptibilities for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by various testing methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 7, p. 2402–2406, 2010.
- CASTANHEIRA, M. et al. Expansion of clonal complex 258 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin American hospitals: Report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 1668–1669, 2012.
- CODJOE, F.; DONKOR, E. Carbapenem Resistance: A Review. **Medical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1, 2017.
- Conferência Internacional sobre Doenças Infecciosas Emergentes 2018 _ CDC**, [s.d.].
- CARRILHO, C. M. D. Caracterização clínica, microbiológica, molecular e tratamento de infecção por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. **Tese**. Faculdade de Medicina da Universidade de São paulo. 2014.
- CARRILHO, C. M. D. et al. A prospective study of treatment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections and risk factors associated with outcome. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016.
- CLSI, DEVELOPMENT, M. Standard for Quality in Your Laboratory With CLSI. 2018.
- DOUMITH, M. et al. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. 659–667, 2009.
- DOYLE, D. et al. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877–3880, 2012.
- DURDU, B. et al. Mortality markers in nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, 2016.
- ELLINGTON, M. J. et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases [1]. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 321–322, 2007.
- ESPOSITO, F. et al. Detection of colistin-resistant mcr-1-positive *Escherichia coli* by use of assays based on inhibition by EDTA and zeta potential. **Journal of Clinical**

Microbiology, v. 55, n. 12, p. 3454–3465, 2017.

FRAENKEL-WANDEL, Y. et al. Mortality due to blaKPC Klebsiella pneumoniae bacteraemia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 4, p. 1083–1087, 2016.

GIACOBBE, D. R. et al. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing Klebsiella pneumoniae: Results from a multicenter case-control study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 12, p. 1106.e1–1106.e8, 2015.

GIAMARELLOU, H. Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p. 614–621, 2016.

HENNEQUIN, C.; ROBIN, F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in Klebsiella pneumoniae. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 3, p. 333–341, 2016.

JEANNOT, K.; BOLARD, A.; PLÉSIAT, P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 5, p. 526–535, 2017.

KEYT, H.; FAVERIO, P.; RESTREPO, M. I. Prevention of ventilator-associated pneumonia in the intensive care unit: A review of the clinically relevant recent advancements. **Indian Journal of Medical Research**, v. 139, n. JUN, p. 814–821, 2014.

LEE, C. R. et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent Klebsiella pneumoniae: Epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. NOV, 2017.

LI, B. et al. Molecular pathogenesis of Klebsiella pneumoniae. **Future Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1071–1081, 2014.

LIU, Y. Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, 2016.

MAGIORAKOS, A. P. et al. The rise of carbapenem resistance in Europe: Just the tip of the iceberg. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 2, n. 1, p. 1, 2013.

MITTAL, G. et al. Risk factors for fecal carriage of carbapenemase producing Enterobacteriaceae among intensive care unit patients from a tertiary care center in India. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2016.

NAVA, R. G. et al. New sequence type in multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae harboring the bla NDM-1 -encoding gene in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 79, p. 101–103, 2019.

NORDMANN, P.; POIREL, L.; DORTET, L. Rapid detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 9, p. 1503–1507, 2012.

PACZOSA, M. K. Klebsiella pneumoniae : Going on the Offense with a Strong Defense. v. 80, n. 3, p. 629–661, 2016.

POIREL, L.; NORDMANN, P.; UNIT, M. M. RAPIDEC® CARBA NP test for rapid detection of carbapenemase producers. n. June, 2015.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.

RECHENCHOSKI, D. Z. et al. Antimicrobial activity evaluation and comparison of methods of susceptibility for Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing Enterobacter spp. isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3,

- p. 509–514, 2017.
- ROJAS, L. J. et al. Clinical Infectious Diseases Advance Access published December 10, 2016. p. 1–12, 2016.
- ROSSI, F. et al. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 98–101, 2017.
- SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 31–37, 2016.
- SHLAES, D. M. The Economic Conundrum for Antibacterial Drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. December 2019, p. 1–7, 2019.
- SRINIVAS, P.; RIVARD, K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. **Current Infectious Disease Reports**, v. 19, n. 11, p. 7–9, 2017.
- TIAN, Y. et al. Prevalence and genotypes of group A rotavirus among outpatient children under five years old with diarrhea in Beijing, China, 2011-2016. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2018.
- TUMBARELLO, M. et al. Infections caused by KPC-producing Klebsiella pneumoniae: Differences in therapy and mortality in a multicentre study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 7, p. 2133–2143, 2015.
- VAN DUIN, D.; PATERSON, D. L. Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 377–390, 2016.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Resistência a antibióticos**, 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance?dom=prime&src=syn>>
- WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance in the environment: A link to the clinic? **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 589–594, 2010.
- XIAO, T. et al. A retrospective, comparative analysis of risk factors and outcomes in carbapenem-susceptible and carbapenem-nonsusceptible Klebsiella pneumoniae bloodstream infections: Tigecycline significantly increases the mortality. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 595–606, 2018.
- XU, L.; SUN, X.; MA, X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2017.
- XU, M. et al. Bloodstream infections caused by Klebsiella pneumoniae: Prevalence of bla KPC , virulence factors and their impacts on clinical outcome. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2018.
- YOUSFI, H. et al. Colistin- and carbapenem-resistant klebsiella pneumoniae clinical isolates: Algeria. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 2, p. 258–263, 2019.
- ZHANG, Y. et al. Risk factors for carbapenem-resistant K. pneumoniae bloodstream infection and predictors of mortality in Chinese paediatric patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.

6. CONCLUSÃO

Os resultados mostram que a infecção da corrente sanguínea causada por *Klebsiella pneumoniae* é devido a condições clínicas complexas complicadas por múltiplas comorbidades anteriores e por procedimentos hospitalares invasivos. O aumento da resistência dos isolados a antimicrobianos está associado as altas taxas de mortalidade relacionadas infecções relacionadas à assistência à saúde. Nossos resultados mostram uma prevalência de isolados XDR e PDR. A produção de carbapenemase do tipo KPC foi o mecanismo mais frequente encontrado. Os isolados clínicos estudados apresentaram elevada similaridade genética, mostrando que pode haver duas cepas *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos predominante no HU-UJEL.

REFERÊNCIAS

- AH, Y. M.; KIM, A. J.; LEE, J. Y. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 1, p. 8–15, 2014.
- ALVES, A. P.; BEHAR, P. R. P. Infecções hospitalares por Enterobacteriaceae produtoras de Kpc em um hospital terciário do sul do Brasil. **Revista da AMRIGS**, v. 57, n. 3, p. 213–218, 2013.
- ANEEL. Instrução Normativa Nº 45, De 22 De Novembro De 2016. **Aneel**, p. 4, 2016.
- ANVISA. Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA**, p. 1–81, 2017.
- BALKHAIR, A. et al. Prevalence and 30-day all-cause mortality of carbapenem-and colistin-resistant bacteraemia caused by *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*: Description of a decade-long trend. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 85, p. 10–15, 2019.
- BAND, V. I. et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* exhibiting clinically undetected colistin heteroresistance leads to treatment failure in a murine model of infection. **mBio**, v. 9, n. 2, p. 1–6, 2018.
- BARAN, I.; AKSU, N. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level reference hospital in Turkey. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2016.
- BARDET, L.; ROLAIN, J. M. Development of new tools to detect colistin-resistance among enterobacteriaceae strains. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2018, n. Mic, 2018.
- BARON, S. et al. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p. 583–591, 2016.
- BARTOLLETTI, F. et al. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 10, p. 1849–1851, 2016.
- BENGOECHEA, J. A.; SA PESSOA, J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: Living to counteract host defences. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 2, p. 123–144, 2019.
- BOSZCZOWSKI, I. et al. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Genetic diversity, mechanisms of resistance to polymyxins and clinical outcomes in a tertiary teaching hospital in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 61, p. 1–9, 2019.
- BRAUN, G. et al. Temporal evolution of polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones recovered from blood cultures in a teaching hospital during a 7-year period. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 3, p. 522–527, 2018.
- BRISSE, S.; PASSET, V.; GRIMONT, P. A. D. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., Isolated from human infections, With two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., And demonstration th. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 3146–3152, 2014.
- BULIK, C. C. et al. Comparison of meropenem MICs and susceptibilities for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by various testing methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 7, p. 2402–2406, 2010.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.
- CANIAUX, I. et al. MCR: modern colistin resistance. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 3, p. 415–420, 2017.
- CAPONE et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 1, p. E23–E30, 2013.
- CARRILHO, C. M. D. et al. A prospective study of treatment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections and risk factors associated with outcome. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016.
- CARRILHO, C. M. D. Caracterização clínica, microbiológica, molecular e tratamento

- de infecção por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. **Tese**. Faculdade de Medicina da Universidade de São paulo. 2014.
- CODJOE, F.; DONKOR, E. Carbapenem Resistance: A Review. **Medical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1, 2017.
- COHEN, J. et al. Sepsis: A roadmap for future research. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 581–614, 2015.
- Conferência Internacional sobre Doenças Infecciosas Emergentes 2018 _ CDC.** , [s.d.].
- CORREA, L. et al. A hospital-based matched case-control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, 2013.
- DAIKOS, G. L. et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: Lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2322–2328, 2014.
- DE OLIVEIRA, M. S. et al. Treatment of KPC-producing Enterobacteriaceae: Suboptimal efficacy of polymyxins. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 2, p. 179.e1-179.e7, 2015.
- DEBBY, B. D. et al. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in an intensive care unit. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 8, p. 1811–1817, 2012.
- DIRSECIU, P. Resistance **Infectio disease**.. p. 1–14, 2017.
- DURDU, B. et al. Mortality markers in nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, 2016.
- ERSHOVA, K. et al. Implementing an infection control and prevention program decreases the incidence of healthcare-associated infections and antibiotic resistance in a Russian neuro-ICU. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2018.
- ESPOSITO, F. et al. Detection of colistin-resistant mcr-1-positive *Escherichia coli* by use of assays based on inhibition by EDTA and zeta potential. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 3454–3465, 2017.
- FARMER, T. H.; DEGNAN, B. A.; PAYNE, D. J. Penetration of β -lactamase inhibitors into the periplasm of Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 176, n. 1, p. 11–15, 1999.
- FLEISCHMANN-STRUZEK, C. et al. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 6, n. 3, p. 223–230, 2018.
- FRAENKEL-WANDEL, Y. et al. Mortality due to blaKPC *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 4, p. 1083–1087, 2016.
- GALES, A. C.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: Results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2006–09). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 9, p. 2070–2074, 2011.
- GIACOBBE, D. R. et al. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: Results from a multicenter case-control-control study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 12, p. 1106.e1-1106.e8, 2015.
- GIAMARELLOU, H. Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p. 614–621, 2016.
- GIANI, T. et al. Large nosocomial outbreak of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* traced to clonal expansion of an mgrb deletion mutant. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 10, p. 3341–3344, 2015.
- GOTO, M. et al. Antimicrobial nonsusceptibility of gram-negative bloodstream isolates, veterans health administration system, United States, 2003-2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 11, p. 1815–1825, 2017.
- GOTO, M.; AL-HASAN, M. N. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 6, p. 501–509, 2013.
- HENNEQUIN, C.; ROBIN, F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious**

- Diseases**, v. 35, n. 3, p. 333–341, 2016.
- ISHIDA, T. *Klebsiella pneumoniae*. **Respiration and Circulation**, v. 52, n. 2, p. 131–135, 2004.
- JAYOL, A. et al. Evaluation of the Rapid Polymyxin NP test and its industrial version for the detection of polymyxin-resistant Enterobacteriaceae. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 92, n. 2, p. 90–94, 2018.
- JEANNOT, K.; BOLARD, A.; PLÉSIAT, P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 5, p. 526–535, 2017.
- KARLOWSKY, J. A. et al. Antimicrobial susceptibility of gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Asia-Pacific countries: SMART 2013-2015. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 61–69, 2017.
- KOHLER, P. P. et al. Carbapenem Resistance, Initial Antibiotic Therapy, and Mortality in *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 38, n. 11, p. 1319–1328, 2017.
- KONTOPIDOU, F. et al. Infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among patients in intensive care units in Greece: A multi-centre study on clinical outcome and therapeutic options. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 2, p. O117–O123, 2014.
- LEE, C. R. et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. NOV, 2017.
- LESCAT, M. et al. Performances of the rapid polymyxin acinetobacter and pseudomonas tests for colistin susceptibility testing. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 4, p. 520–523, 2019.
- LI, B. et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. **Future Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1071–1081, 2014.
- LIU, Y. Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, 2016.
- LIVERMORE, D. M. B-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 557–584, 1995.
- LOONEN, A. J. M. et al. Biomarkers and molecular analysis to improve bloodstream infection diagnostics in an emergency care unit. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2014.
- MAGILL, S. S. et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 13, p. 1198–1208, 2014.
- MAGIORAKOS, A. P. et al. The rise of carbapenem resistance in Europe: Just the tip of the iceberg. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 2, n. 1, p. 1, 2013.
- MARTINEZ, R. M. et al. Evaluation of three rapid diagnostic methods for direct identification of microorganisms in positive blood cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2521–2529, 2014.
- MATTHEW E. FALAGAS et al. Deaths Attributable to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 7, p. 1170–1175, 2014.
- MONTEIRO, J. et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333–334, 2009.
- MUNOZ-PRICE, L. S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 785–796, 2013.
- MUSICHA, P. et al. Trends in antimicrobial resistance in bloodstream infection isolates at a large urban hospital in Malawi (1998–2016): a surveillance study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1042–1052, 2017.
- NAUMOVSKI, L. et al. Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended-spectrum β -lactamase in isolates from cancer patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 9, p. 1991–1996, 1992.

- OPOTA, O. et al. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: State of the art. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 4, p. 313–322, 2015.
- PACZOSA, M. K. Klebsiella pneumoniae : Going on the Offense with a Strong Defense. v. 80, n. 3, p. 629–661, 2016.
- PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, M. et al. Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae bloodstream infection in critically ill patients: risk factors and predictors of mortality. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 7, p. 1125–1131, 2017.
- PENDLETON, J. N.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 11, n. 3, p. 297–308, 2013.
- POGUE, J. M. et al. Appropriate antimicrobial therapy in the era of multidrug-resistant human pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 4, p. 302–312, 2015.
- RODRIGUES, A. C. S. et al. Non-clonal occurrence of pmrB mutations associated with polymyxin resistance in carbapenem-resistant klebsiella pneumoniae in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 4, p. 1–6, 2019.
- ROJAS, L. J. et al. Clinical Infectious Diseases Advance Access published December 10, 2016. p. 1–12, 2016.
- SHILO, S. et al. Risk factors for bacteriuria with carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae and its impact on mortality: A case-control study. **Infection**, v. 41, n. 2, p. 503–509, 2013.
- SIRIJAN SANTAJIT; NITAYA INDRAWATTANA. Mechanisms of antimicrobial resistance in Pasteurellaceae. **PBioMed Research International**, v. 2016, p. 267, 2016.
- SMITH, M. Antibiotic Resistance Mechanisms. **Journeys in Medicine and Research on Three Continents Over 50 Years**, n. May 2017, p. 95–99, 2017.
- SPYROPOULOU, A. et al. A ten-year surveillance study of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in a tertiary care Greek university hospital: Predominance of KPC- over VIM- or NDM-producing isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 240–246, 2016.
- SRINIVAS, P.; RIVARD, K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. **Current Infectious Disease Reports**, v. 19, n. 11, p. 7–9, 2017.
- SULTAN, I. et al. Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. SEP, 2018.
- SUN, J. et al. Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 9, p. 794–808, 2018.
- TIAN, Y. et al. Prevalence and genotypes of group A rotavirus among outpatient children under five years old with diarrhea in Beijing, China, 2011-2016. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2018.
- TUMBARELLO, M. et al. Infections caused by KPC-producing Klebsiella pneumoniae: Differences in therapy and mortality in a multicentre study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 7, p. 2133–2143, 2015.
- VARDAKAS, K. Z. et al. Characteristics, risk factors and outcomes of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infections in the intensive care unit. **Journal of Infection**, v. 70, n. 6, p. 592–599, 2015.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991.
- VISCOLI, C. Bloodstream Infections: The peak of the iceberg. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 248–251, 2016.
- WALSH, K. M. Authors : Ac c te d us cr ip t Ac c ep te us cr t. v. 40, p. 1–30, 2018.
- WILSON, J. et al. Trends among pathogens reported as causing bacteraemia in England, 2004-2008. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 3, p. 451–458, 2011.
- WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals : Analysis of 24 , 179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study Author (s): Hilmar Wisplinghoff , Tammy Bischoff , Sandra M . Tallent , Harald Seifert , Richard Published by : Oxford Univer. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 309–317, 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Resistência a antibióticos**, 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance?dom=prime&src=syn>>

- XIAO, T. et al. A retrospective, comparative analysis of risk factors and outcomes in carbapenem-susceptible and carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: Tigecycline significantly increases the mortality. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 595–606, 2018.
- XU, L.; SUN, X.; MA, X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2017.
- XU, M. et al. Bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: Prevalence of bla_{KPC}, virulence factors and their impacts on clinical outcome. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2018.
- YANG, F. et al. High rate of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from human and animal origin. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 2729–2737, 2019.
- YOUSFI, H. et al. Colistin- and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates: Algeria. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 2, p. 258–263, 2019.
- ZAVASCKI, A. P. et al. Emergence of polymyxin B resistance in a polymyxin B-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* causing bloodstream infection in a neutropenic patient during polymyxin B therapy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 90, n. 2, p. 134–138, 2018.
- ZHANG, Y. et al. Risk factors for carbapenem-resistant *K. pneumoniae* bloodstream infection and predictors of mortality in Chinese paediatric patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.
- ZHAO, Z. et al. Evaluation of automated systems for aminoglycosides and fluoroquinolones susceptibility testing for Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 4–9, 2017.

ANEXOS

ANEXO A - Instrumento de coleta de dados da pesquisa.

ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina CAAE 43013315.8.0000.5231

ANEXO A

Paciente: _____ Idade: _____

Prontuário: _____ Sexo: _____ Sensibilidade: _____

Diagnóstico: _____

Local de internamento: _____ Data do internamento: ____/____/____

UTI ()SIM ()NÃO Dias na UTI: _____

Data da HMA +: ____/____/____ Óbito ()SIM ()NÃO

Dias do internamento até o óbito: _____

Dias da HMA + até o óbito: _____

Comorbidades: _____

Procedimentos invasivos _____

ATB 14 dias antes: _____

Outras infecções: _____

ATB 14 dias após: _____

Exames LAB: _____

Charlson Comorbidity Scoring System

PRONTUÁRIO: _____

Age yrs

One Point

- Myocardial infarction (history, not ECG changes only)
- Congestive heart failure
- Peripheral diseases (includes aortic aneurysm ≥ 6 cm)
- Cerebrovascular disease: CVA with mild or no residua or TIA
- Dementia
- Chronic pulmonary disease
- Connective tissue disease (IMUNO)
- Peptic ulcer disease
- Mild liver disease (without portal hypertension, includes chronic hepatitis)
 - AST_____ ALT_____ Sorologia + Hep B () Hep C ()
- Diabetes without end-organ damage (excludes diet-crotrolled alone)
-

Two Points

- Hemiplegia
- Moderate or severe renal disease: Creatinina: _____ Clearence: _____
- Diabetes with end-organ damage (retinopathy, neuropathy, nephropathy, or brittle diabetes)
- Tumor without metastasis (exclude if > 5 y from diagnosis)
- Leukemia (acute or chronic)
- Lymphoma
-

Three Points

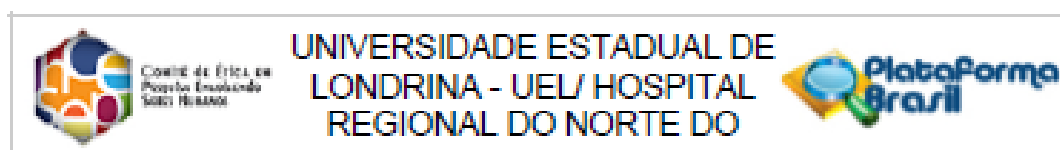
- Moderate or severe liver disease
 - AST_____ ALT _____ Sorologia + Hep B () Hep C ()

Six Points

- Metastatic solid tumor
- AIDS (nor just HIV positive)
 - Carga viral _____ CD4 _____

QUICK SOFA: Glasgow < 15 () FR ≥ 22 () PA sis ≤ 100 ()

ANEXO B



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE: FATORES CONTRIBUÍNTES, IMPLANTAÇÃO DE MEDIDAS DE CONTROLE E AVALIAÇÃO DO IMPACTO NOS INDICADORES DE SAÚDE.

Pesquisador: Giselena Kerbauy Lopes

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 43013315.8.0000.5231

Instituição Proponente: CCS - Departamento de Enfermagem

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.058.863

Data da Relatoria: 04/05/2015

Apresentação do Projeto:

As infecções relacionadas à assistência à saúde estão entre as principais causas de morbimortalidade, associadas às pessoas que se submetem a procedimentos clínicos. São consideradas um problema relevante de saúde pública, que resulta em índices elevados de complicações à saúde, prolongamento do período de hospitalização, aumento direto sobre os custos da assistência, além de favorecer a seleção e disseminação de microrganismos multiresistentes. Essas infecções respondem por grande impacto na saúde pública e por isso o seu controle tornou-se um desafio para os profissionais e gestores da área da saúde. O presente projeto tem como objetivo estudar as variáveis que favorecem o desenvolvimento das infecções relacionadas à assistência, implantar medidas recomendadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e avaliar o impacto destas medidas nos indicadores de saúde, visando reduzir a morbidade e mortalidade dos pacientes atendidos no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná da Universidade Estadual de Londrina. Estudo longitudinal prospectivo, quantitativo, com amostragem de pacientes com infecção hospitalar atendidos na instituição do estudo ou que possuam fatores de risco para infecções (Imunossupressão, extremos de idade, antibioticoterapia, internação em unidades de terapia intensiva, procedimentos invasivos e cirúrgicos). O estudo será constituído de 3 etapas: Período pré-intervenção; Período de intervenção e Período pós-intervenção.

Endereço: PROPPG - LABESC - Sala 3

Bairro: Campus Universitário

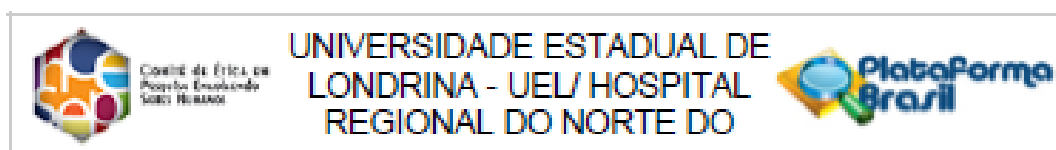
CEP: 86.057-070

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep206@uel.br



Continuação do Parecer: 1.056.003

Os dados serão coletados dos prontuários dos pacientes, do serviço de arquivo médico, das fichas de notificação de IRAS (anexo 1) e dos laudos laboratoriais. Nenhuma informação será coletada diretamente do paciente ou seus familiares. Para o cálculo dos custos hospitalares será utilizado dados dos setores de custos, farmácia e laboratório.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar os fatores que favorecem o desenvolvimento das Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e Implantar medidas de controle e prevenção em um hospital escola.

Objetivo Secundário:

•Caracterizar os pacientes com IRAS quanto às variáveis clínico epidemiológicas;•Identificar os fatores de risco para o desenvolvimento das IRAS;•Adequar a Infra estrutura Institucional às medidas preventivas propostas pelas entidades nacionais (Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária);•Promover a adesão das medidas de controle e prevenção das IRAS pelos profissionais de saúde da Instituição;•Estimar os custos hospitalares relacionados à pacientes Internados com IRAS até o desfecho clínico;•Avaliar o impacto das medidas Instituídas nos Indicadores de saúde.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo não oferece risco aos pacientes, tendo em vista que as medidas de prevenção das IRAS serão elaboradas com base nas diretrizes do Manual de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde: Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2013), que reúne as melhores evidências científicas sobre estratégias de prevenção e controle das IRAS.

Significativas reduções nas taxas de IRAS tem sido mostradas por Instituições que aplicaram as medidas preventivas recomendadas pelos órgãos de referência nacional e internacional (BRASIL, 2013). Além do benefício direto aos pacientes, com aumento da sobrevida, a Implantação das medidas preventivas para IRAS proporcionará a capacitação dos profissionais e estudantes da Instituição quanto a assistência segura ao paciente no âmbito da prevenção das complicações infecciosas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e proporcionará benefícios importantes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão adequados:

Endereço: PROPPG - LABESC - Sala 3
 Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-070
 UF: PR Município: LONDRINA
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep066@uel.br



Conselho de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL
REGIONAL DO NORTE DO



Continuação do Parecer: 1.056.003

Folha de rosto; confidencialidade e sigilo e unidade cop-participante.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

LONDRINA, 12 de Maio de 2015

Assinado por:
Paula Mariza Zedu Alliprandini
(Coordenador)

Endereço: PROPPG - LABESC - Sala 3

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-070

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep055@uel.br