



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GERUSA LUCIANA GOMES MAGALHÃES

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR
DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* E *PROVIDENCIA
STUARTII* DE ISOLADOS DE PACIENTES DE UM
HOSPITAL DE REFERÊNCIA DE COVID-19 DO SUL DO
BRASIL**

Londrina
2023

GERUSA LUCIANA GOMES MAGALHÃES

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR
DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* E *PROVIDENCIA
STUARTII* DE ISOLADOS DE PACIENTES DE UM
HOSPITAL DE REFERÊNCIA DE COVID-19 DO SUL DO
BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Estadual de Londrina - UEL, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero

Londrina

2023

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

M188c Magalhães, Gersa Luciana Gomes .
CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE E PROVIDENCIA STUARTII DE ISOLADOS DE PACIENTES DE UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DE COVID-19 DO SUL DO BRASIL / Gersa Luciana Gomes Magalhães. - Londrina, 2023.
86 f. : il.

Orientador: Eliana Carolina Vespero.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Resistência em isolados de Klebsiella pneumoniae e Providencia stuartii - Tese. I. Vespero, Eliana Carolina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

CDU 61

GERUSA LUCIANA GOMES MAGALHÃES

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR
DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* E *PROVIDENCIA
STUARTII* DE ISOLADOS DE PACIENTES DE UM
HOSPITAL DE REFERÊNCIA DE COVID-19 DO SUL DO
BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual de
Londrina - UEL, como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutor em
Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero
Departamento PAC-CCS-UEL

Profa. Dra. Márcia Regina Eches Perugini
Departamento PAC-CCS-UEL

Profa. Dra. Floristher Elaine Carrara
Departamento PAC-CCS-UEL

Dra. Zuleica Naomi Tano
Departamento de Clínica Médica-CCS- UEL

Profa. Dra. Daniele Zendrini Rechenchoski
Departamento de Microbiologia-CCS-UEL

Londrina, 20 de abril de 2023

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força que proporcionou para concluir esta tão sonhada etapa da minha vida. Agradeço pelas bênçãos que recaíram não somente sobre mim, mas também sobre todos os amigos, familiares e professores.

À minha orientadora Eliana Carolina Vespero pela orientação incansável, que através dos seus ensinamentos transforma a vida de tantos alunos e conseqüentemente de seus familiares. Tenho muito orgulho e admiração, porque você é um exemplo de ser humano e profissional, é extremamente comprometida em tudo o que se destina a fazer. Serei eternamente grata pela dedicação, confiança e amizade sincera.

À minha família, meus filhos Adilson Júnior e Gabriela Magalhães, minha mãe Vera Lúcia, minhas irmãs Silvia Clay e Maria Priscila, especialmente pelo amor que transmitiram neste período.

À minha amiga e professora Márcia Regina Eches Perugini que sempre me apoiou. Você é uma pessoa iluminada, de coração grande, que deixa marcas positivas e permanentes. Você mais do que qualquer um, acreditou em mim e te levarei para sempre em meu coração.

À professora Marsileni Pelisson pelo carinho, reconhecimento e por ser inspiração na minha caminhada.

À professora Floristher Elaine Carrara pelo apoio, elucidações e pela inteligência impar que permeou toda a minha trajetória. Jamais esquecerei o que fez por mim.

À Dra. Daniela Rechenchoski pelo carisma, alegria e generosidade.

À Dra. Zuleica Naomi Tano pela parceria com o Laboratório de Microbiologia que possibilita grandes progressos e ensinamentos. Você é especial no sentido profissional e pessoal.

Aos companheiros de trabalho e também amigos do laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário de Londrina, pela torcida e cooperações valiosas à Alice, Claudinéia, Danna, Emílio, Fábio, Gêneci, Ivone, Marízia, Maura, Priscila, Sidney e Sueli, recebam a minha admiração e gratidão eterna.

A melhor equipe e agora amigos que conquistei durante esta trajetória, Luana, João Gabriel, Felipe, Stefani, Tiago Danelli e em especial à Júlia.

Ao meu namorado Márcio Alex, que me enche de amor, empolga meus dias e trouxe motivação para eu finalizar este trabalho.

Em especial, *in memoriam*, dedico toda minha formação acadêmica a minha avó Maria Benedita Gomes Garcia.

E a mim mesmo, por todo o esforço que dediquei.

MAGALHÃES, Gerusa Luciana Gomes. **CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* E *PROVIDENCIA STUARTII* DE ISOLADOS DE PACIENTES DE UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DE COVID-19 DO SUL DO BRASIL.** 2023. 86. Trabalho de Conclusão de Curso para a obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Londrina, 2023.

RESUMO

A emergência e disseminação de resistência às polimixinas em *Klebsiella pneumoniae* está aumentando em todo o mundo, tornando-se um sério problema de saúde pública. Também, durante a pandemia de COVID-19, *Providencia stuartii* resistentes aos carbapenêmicos (PsCR) tornou-se um sério problema na terapia antimicrobiana. Neste contexto, este trabalho teve como objetivos caracterizar *K.pneumoniae* isoladas da corrente sanguínea (ICS) resistentes aos carbapenêmicos e às polimixinas (KpnCRPR) de 2015 à 2020 e investigar o aumento de cepas de PsCR de abril a setembro de 2021 de pacientes do Hospital Universitário de Londrina (HU-UEL). Foram estudados 44 isolados de KpnCRPR e 21 isolados de PsCR. As amostras foram identificadas pelo sistema de automação Vitek2®. O sequenciamento completo do genoma foi realizado de acordo com os protocolos e a plataforma Illumina. As bases de dados Enterobase, MLST, NCBI e GenBank foram utilizadas para a análise do sequenciamento. O sequenciamento de KpnCRPR mostrou que todos os isolados apresentaram *blaKPC-2*, *blaTEM 1D* e *blaSHV-11* e resistência às polimixinas devido o gene *mrgB*. O sequence Type (ST) 11 foi identificado em 40 (91%) e ST 258 em 4 (9%) isolados. KpnCRPR apresentaram 5 grupamentos principais, com pequenas variabilidades genéticas nos grupos D e E. O índice de comorbidade de Charlson mostrou que 68,1% dos pacientes com ICS tinham pontuação > 2. Todos os pacientes foram submetidos a algum tipo de procedimento invasivo, como: cateter venoso central (CVC) 77,3%, ventilação mecânica (VM) 72,7%, sonda vesical de demora (SVD) 34,1% e hemodiálise (HD) 22,7%. O uso prévio de polimixinas foi observado em 72,7% dos pacientes e 59% evoluíram para óbito. Os isolados de PsCR apresentaram a enzima NDM-1 e relação clonal acima de 87% de similaridade genética entre os isolados, determinada pelo ERIC-PCR. Quando comparados os dados clínicos dos pacientes com infecção por *P. stuartii* NDM-1 com *P. stuartii* não NDM-1, os resultados significativos foram: COVID-19 positivo ($p = 0,013$); uso de procedimentos invasivos como: CVC ($p = 0,012$), VM ($p = 0,006$), HD ($p = 0,033$) e SVD ($p = <001$). O uso prévio de aminoglicosídeos ($p = 0,025$), polimixinas ($p = 0,038$), tigeciclina ($p = 0,033$), vancomicina ($p = 0,045$); e o desfecho clínico óbito ($p = 0,021$). Diante dos resultados obtidos, concluímos que estudos moleculares de isolados de interesse clínico fornecem uma compreensão da diversidade genética da população bacteriana, contribuindo com informações importantes para controle da disseminação destes mecanismos de resistência no ambiente hospitalar.

Palavras chave: *Providencia stuartii*; *Klebsiella pneumoniae*; carbapenemases; NDM; KPC.

MAGALHÃES, Gerusa Luciana Gomes. **EPIDEMIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AND *PROVIDENCIA STUARTII* OF ISOLATES FROM PATIENTS AT A COVID-19 REFERENCE HOSPITAL IN SOUTHERN BRAZIL.** 2023. 86. Completion of course work to obtain the title of Doctor in Clinical and Laboratory Pathophysiology. Health Sciences Center. State University of Londrina, 2023.

Abstract

The emergence and spread of polymyxin resistance in *Klebsiella pneumoniae* is increasing worldwide, becoming a serious public health problem. Also, during the COVID-19 pandemic, carbapenem-resistant *Providencia stuartii* (PsCR) has become a serious problem in antimicrobial therapy. In this context, this study aimed to characterize *K.pneumoniae* isolated from the bloodstream (BSI) resistant to carbapenems and polymyxins (KpnCRPR) from 2015 to 2020 and to investigate the increase in PsCR strains from April to September 2021 in patients at Hospital University of Londrina (HU-UEL). 44 KpnCRPR and 21 PsCR isolates were studied. The samples were identified by the Vitek2® automation system. Whole genome sequencing was performed according to the Illumina platform and protocols. Enterobase, MLST, NCBI and GenBank databases were used for sequencing analysis. KpnCRPR sequencing results showed that all isolates showed blaKPC-2, blaTEM 1D and blaSHV-11 and polymyxin resistance due to the *mrgB* gene. Sequence Type (ST) 11 was identified in 40 (91%) and ST 258 in 4 (9%) isolates. KpnCRPR had 5 main clusters, with small genetic variability in groups D and E. Charlson's comorbidity index showed that 68.1% of patients with BSI had a score > 2. All patients underwent some type of invasive procedure such as: central venous catheter (CVC) 77.3%, mechanical ventilation (MV) 72.7%, indwelling urinary catheter (SVD) 34.1% and hemodialysis (HD) 22.7%. Previous use of polymyxins was observed in 72.7% of patients and 59% died. PsCR isolates showed NDM-1 enzyme and clonal relationship above 87% of genetic similarity between isolates, determined by ERIC-PCR. When comparing the clinical data of patients with *P. stuartii* NDM-1 infection with non-NDM-1 *P. stuartii*, the significant results were: positive COVID-19 ($p= 0.013$); use of invasive procedures such as: CVC ($p= 0.012$), MV ($p= 0.006$), HD ($p= 0.033$) and SVD ($p= <001$). Previous use of aminoglycosides ($p= 0.025$), polymyxins ($p= 0.038$), tigecycline ($p= 0.033$), vancomycin ($p= 0.045$); and the clinical outcome death ($p= 0.021$). In view of the results obtained, we conclude that molecular studies of isolates of clinical interest provide an understanding of the genetic diversity of the bacterial population, contributing with important information to control the dissemination of these resistance mechanisms in the hospital environment.

Keywords: *Providencia stuartii*; *Klebsiella pneumoniae*; carbapenemases; NDM; KPC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Número de <i>K. pneumoniae</i> identificadas, no período de 2015 a 2020 de pacientes internados no HU-UEL.....	34
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para investigação de genes codificadores de carbapenemases, <i>mcr-1</i> e ERIC-PCR.....	40
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AVC.....	Acidente vascular cerebral
Blac.....	Betalactamases
BGN.....	Bacilo Gram Negativo
ESBL.....	Betalactamase de espectro estendido
CIM.....	Concentração inibitória mínima
CRE.....	Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos
HU-UEL.....	Hospital Universitário de Londrina
IMP.....	Imipenemase
ICS.....	Infecção da corrente sanguínea
Kdo.....	Ácido 3-desoxi-Dmanno-octulosônico
KPC.....	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
KpnCRPR.....	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos e polimixinas
L-Ara4N.....	4-amino-4-desoxi-L-arabinose
LPS.....	Lipopolissacarídeo
MBL.....	Metalo-betalactamase
MCR.....	Mediated colistin resistance
MR.....	Multirresistentes
NDM.....	New Delhi Metallo-betalactamase
OMS.....	Organização Mundial da Saúde
OXA-48.....	Oxacilinas-48
PDR.....	Pan-resistente
PAV.....	Pneumonia associada à ventilação mecânica
PEtN.....	Fosfoetanolamina
PsCR.....	<i>Providencia stuartii</i> resistente aos carbapenêmicos
RAM.....	Resistência antimicrobiana
SAME.....	Serviço de Arquivo Médico e Estatística
SARS.....	Síndrome respiratória aguda
SARS-COV-2.....	Síndrome respiratória aguda grave-Coronavírus 2
ST.....	Sequence Typing

TC.....Sistema componente
SVD.....Sonda Vesical de Demora
UTI.....Unidade de Terapia Intensiva
VIM.....Verona-integron-encoded-metallo-betalactamase
BSI.....Bloodstream infection
MDRB..... Multidrug-resistant bacteria
KPCR..... Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	15
1.1.1 Infecção de Corrente Sanguínea por <i>K. pneumoniae</i>	15
1.1.2 Principais Mecanismos de Resistência em <i>K. pneumoniae</i>	17
1.1.3 Resistência às Polimixinas em <i>Klebsiella</i> sp.....	20
1.2 PROVIDENCIA STUARTII	25
1.2.1 Principais Mecanismos de Resistência Encontrados em <i>P. stuartii</i>	25
1.3 COINFEÇÕES OU INFECÇÕES SECUNDÁRIAS CAUSADAS POR COVID-19.....	28
1.4 AUMENTO do consumo de antibióticos na pandemia de Sars-cov-2.....	29
2.JUSTIFICATIVA.....	30
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3.2.1 <i>K. pneumoniae</i>	31
3.2.2 <i>P. stuartii</i>	31
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO DE <i>K. PNEUMONIAE</i>	32
4.1.1 Critérios de Inclusão.....	32
4.1.2 Critérios de Exclusão.....	32
4.1.3 Identificação de Amostras.....	33
4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO DE <i>P. STUARTII</i>	34
4.2.1 Critérios de Inclusão.....	34
4.3 COLETA DE DADOS.....	35
4.4 TESTES FENOTÍPICOS.....	35
4.4.1 mCIM - Modified Carbapenem Inactivation Method.....	35
4.4.2 eCIM - EDTA - Carbapenem Inactivation Method.....	35
4.4.3 Teste de Diluição em Ágar – Colispor e Polispor (Teste da “Gota”)	36
4.4.4 Microdiluição em Caldo.....	37
4.4.5 Polimixina NP (Nordman/Poirel).....	37
4.5 TESTES GENOTÍPICOS.....	38
4.5.1 Extração.....	39
4.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	39

4.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase, Baseada em Sequências Repetitivas Intergênicas em Enterobactérias (ERIC –PCR)	40
4.5.4 Sequenciamento Completo do Genoma.....	41
4.5.5 Análises de Bioinformática.....	41
5 RESULTADOS.....	43
6 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

K. pneumoniae é um bacilo Gram negativo (BGN), pertencente à ordem das Enterobacterales, membro da família Enterobacteriaceae, não exigente nutricionalmente, encapsulado, imóvel e anaeróbio facultativo (LIAO; LIU; ZHANG, 2020). O gênero *Klebsiella* compreende atualmente uma grande diversidade de espécies (*K. indica*, *K. terrigena*, *K. spallanzanii*, *K. huaxiensis*, *K. oxytoca*, *K. grimontii*, *K. pasteurii* e *K. michiganensis*), incluindo espécies pertencentes ao complexo de *K. pneumoniae* (DONG et al., 2022).

K. pneumoniae pode causar diferentes tipos de infecções hospitalares e comunitárias, incluindo infecções da corrente sanguínea (ICS), do trato urinário, pneumonia, abscesso hepático, infecções do sítio cirúrgico, especialmente em pacientes imunocomprometidos (CHEN et al., 2021b; LIAO; LIU; ZHANG, 2020; TAN et al., 2019).

Além de sua importância como patógeno hospitalar, *K. pneumoniae* pode ser encontrada em uma ampla variedade de nichos ambientais e exibe extensa diversidade fenotípica e genética (WYRES et al., 2019).

Estudos genômicos mostraram que a população de *K. pneumoniae* é diversa e altamente estruturada, proporcionando a compreensão da epidemiologia e evolução da variabilidade genética relevante clinicamente. A compreensão é fundamental para a interpretação dos mecanismos de resistência antimicrobiana, patogenicidade e/ou virulência em *K. pneumoniae*, e para a definição de estratégias efetivas de controle de infecção (LAM et al., 2021; WYRES; LAM; HOLT, 2020).

1.1.1 Infecção de Corrente Sanguínea por *K. pneumoniae*

As ICS estão frequentemente associadas a doenças graves, com alta morbidade e mortalidade. O aumento mundial da incidência de ICS aparece como uma das principais causas de morte, especialmente em pacientes críticos. O aumento da mortalidade por ICS pode estar relacionado com atraso ou tratamento inadequado do agente infeccioso (PEKER et al., 2018). As ICS

podem levar a internações hospitalares prolongadas, complicações graves, além de altos custos para os sistemas de saúde (ZOABI et al., 2021).

Estudos sobre as estimativas populacionais na América do Norte e na Europa em 2013, mostraram que a incidência de ICS foi de 113 e 204 por 100.000 habitantes, respectivamente. Esse dado é semelhante ao acidente vascular cerebral (AVC) ou trombose venosa, mas muito maior do que, por exemplo, artrite reumatoide, pancreatite aguda ou diabetes mellitus tipo I. Em países de alta renda, a estimativa de ICS hospitalar, varia aproximadamente entre 30% e 50% dos casos (CONRAD et al., 2018; KERN; RIEG, 2020; THRIFT et al., 2017).

As taxas crescentes de patógenos resistentes aos antimicrobianos limitam as opções de tratamento, particularmente em BGN, o que geralmente leva ao uso empírico de uma variedade de antimicrobianos (ZOABI et al., 2021).

As ICS por Enterobacterales são potencialmente fatais, e tornaram-se cada vez mais um problema de saúde pública, podendo levar a uma taxa de mortalidade de até 48% (CHEN et al., 2021b). Entretanto, em casos de *K. pneumoniae*, a taxa de mortalidade é de aproximadamente 20-30% (MARTIN; BACHMAN, 2018). No Brasil, ICS por *K. pneumoniae* de pacientes hospitalizados apresentou uma taxa de mortalidade de 72,9% (SOARES DE MORAES et al., 2022).

K. pneumoniae é considerada a segunda principal causa de ICS por BGN, menos frequente que *E. coli* (MARTIN; BACHMAN, 2018). Bacteremia por *K. pneumoniae* produzindo betalactamase de espectro estendido (ESBL), acarreta um pior prognóstico, incluindo internações frequentes nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e maior letalidade após 30 dias de internação (DE ANGELIS et al., 2018).

O aumento de *K. pneumoniae* como um patógeno de bacteremia foi observado na Itália no período de 2007 a 2012. A resistência aos carbapenêmicos também aumentou nesses isolados, e durante esse período foi observado, a nível hospitalar, uma variação de taxa de 4% para 52%, e a nível comunitário de 0% para 18% (KERN; RIEG, 2020). Na China, a taxa de ICS por *K. pneumoniae* resistente a meropenem e imipenem aumentou de 11,2% em 2018 para 27,1% em 2020 (LIU et al., 2022a).

1.1.2 Principais Mecanismos de Resistência em *K. pneumoniae*

A resistência aos antimicrobianos, em BGN, foi descrita inicialmente na década de 60, no entanto, nos últimos anos, tornou-se um problema global de saúde pública, sendo previsto causar em todo o mundo, até o ano de 2050, mais de 10 milhões de mortes anuais (BAND et al., 2018; CHEN et al., 2021a; VAN DUIN; DOI, 2017). Contudo, durante a COVID-19 ocorreu um crescimento exponencial do uso de antibióticos, contribuindo para a seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos, incluindo produtores de carbapenemases (AYOUB MOUBARECK; HAMMOUDI HALAT, 2022).

Em 2019, devido ao impacto na saúde humana, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu a resistência antimicrobiana (RAM) como uma das dez principais ameaças à saúde global (MANCUSO et al., 2021).

Embora a resistência aos antimicrobianos em *K. pneumoniae* pode surgir por meio de mutações cromossômicas, a maior parte resulta da aquisição de genes, por transferência horizontal, principalmente através de grandes plasmídeos conjugativos (PHILIPPON et al., 2019; ROZWANDOWICZ et al., 2018; YANG et al., 2021). O acúmulo de determinantes de resistência em um único isolado de *K. pneumoniae*, pode resultar em uma cepa pan-resistente (PDR), dificultando o tratamento com os antimicrobianos disponíveis (AL-QURAINI et al., 2022).

O principal mecanismo de resistência de BGN aos β -lactâmicos é a produção de betalactamases (Blac), que são enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, inativando o antimicrobiano e impedindo a atividade contra as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

As Blac são classificadas bioquimicamente em duas grandes categorias, de acordo com o mecanismo pelo qual realizam hidrólise, seja pela formação de uma enzima acila pela presença de uma serina do sítio ativo ou por meio de uma reação hidrolítica facilitada por um ou dois íons de zinco, essenciais nos sítios ativos de Metallo- betalactamases (MBL) (BUSH, 2018).

Após as análises de sequência se tornarem disponíveis, as Blac foram classificadas em quatro classes moleculares baseadas no tamanho molecular e

homologia de aminoácidos presentes no sítio ativo das enzimas (VAN DUIN; DOI, 2017). O sistema de classificação de Ambler agrupa as Blac em quatro grupos principais (A-B-C e D) (PHILIPPON et al., 2019). As carbapenemases que conferem resistência ao ertapenem, imipenem, meropenem ou outro carbapenêmico em Enterobacteriales pertencem a 3 classes: A, B e D (BASSETTI; PEGHIN, 2018; BREIJYEH; JUBEH; KARAMAN, 2020), dentro dessas classes, as carbapenemases mais prevalentes são as do tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), imipenemase (IMP), Verona-integron-encoded-metallo-betalactamase (VIM), New Delhi Metallo betalactamase (NDM) e oxacilinase-48 (OXA-48), que são rotineiramente relatadas em muitas infecções no mundo todo (AYOUB MOUBARECK; HAMMOUDI HALAT, 2022).

As enzimas de classe A incluem a KPC, bem como as não metalo-carbapenemase-A (NMC-A) e *Serratia marcescens* enzymes (SME), que são menos frequentes, mas que podem ser encontradas em *Enterobacter cloacae* e *S. marcescens*, respectivamente. Geneticamente relacionadas, as variantes dos genes KPC-2 e KPC-3 são responsáveis pela maior parte dos genes codificados de KPC detectados globalmente (BUSH; BRADFORD, 2019).

As enzimas da classe B incluem as MBL, como NDM, IMP e VIM que são as enzimas mais frequentes encontradas em todo o mundo. São distinguidas pela presença de íons de Zn^{2+} no sítio ativo da enzima, capazes de hidrolisar uma grande variedade de betalactâmicos, mas não de hidrolisar o monobactâmico aztreonam (BUSH; BRADFORD, 2019; GIURAZZA et al., 2021).

As carbapenemases de classe D produzidas por Enterobacteriales incluem as Blac OXA-48, que induzem a hidrólise de penicilinas e carbapenêmicos, mas não de cefalosporinas. Como consequência, podem ser mais difíceis de detectar, e por isso, foram chamadas de “a ameaça fantasma” (POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012). Entretanto, a resistência em altos níveis aos carbapenêmicos pode ocorrer quando são encontradas em combinação com outras Blac, como ESBL, ou com alterações de porina que levam à mudança da permeabilidade da membrana externa (VAN DUIN; DOI, 2017).

Os primeiros genes de resistência em BGN localizados em elementos genéticos móveis, foram descritos na década de 1960 em uma amostra de *E.coli* de sangue, denominada de TEM (Temoniera), e posteriormente, em 1973, foi detectado o gene SHV-1 (Sulfidril Variável), em Enterobacteriaceae (WYRES; HOLT, 2018).

Após a introdução de cefalosporinas de terceira geração para o uso clínico no início da década de 1980, os genes de ESBL que conferem resistência a estes fármacos, começaram a ser detectados e caracterizados. Atualmente a ESBL mais amplamente disseminada é do tipo CTX-M (Cefotaximase) (SHURINA; PAGE, 2021).

A introdução de carbapenêmicos na década de 1990, foi acompanhada pelo rápido aparecimento de genes de resistência, como a descoberta do *blaKPC*, que foi descrito em meados da década de 1990 nos EUA e impulsionou a disseminação global deste gene e conseqüentemente a ocorrência de surtos hospitalares (MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015).

O gene *blaKPC* foi identificado pela primeira vez em um isolado de *K. pneumoniae*, mas variantes deste gene podem ser encontrados em muitas espécies de BGN, incluindo Enterobacterales e BGN não fermentadores como, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (BASSETTI et al., 2018).

Os carbapenêmicos são frequentemente a última opção terapêutica para as infecções recorrentes por BGN, portanto a prevalência crescente de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases é considerada uma grande ameaça à saúde pública (MANCUSO et al., 2021; VAN DUIN; DOI, 2017).

Outra carbapenemase que também foi identificada pela primeira vez em *K. pneumoniae*, é a enzima OXA-48, encontrada na Turquia em 2003 (POIREL et al., 2004). Inicialmente, esta enzima foi responsável por surtos hospitalares em toda a Europa e atualmente é descrita no mundo todo (BOYD et al., 2022; MAIRI et al., 2018), embora não tão amplamente dispersa como o gene que codifica a enzima KPC (WYRES; HOLT, 2018).

Novamente, outro gene detectado pela primeira vez em *K. pneumoniae* foi o *blaNDM-1*, encontrado em 2008 de um paciente que viajou para a Índia (YONG et al., 2009). Logo depois, este gene foi relatado em diferentes cepas de *K. pneumoniae*, isoladas de pacientes que realizaram ou não viagens recentes para a Índia (CHANG et al., 2021; RANJAN; THATIKONDA, 2021).

Em 2010, a enzima NDM-1 se disseminou, por meio de numerosos plasmídeos, para diferentes espécies de Enterobacterales (POIREL et al., 2011). Posteriormente, em 2011, foi relatado em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* (YEHOUEYOU et al., 2021).

É notável o predomínio de *K. pneumoniae* entre os primeiros relatos clínicos de novos genes de resistência aos antimicrobianos, o que indica que este microrganismo é o alvo principal para a vigilância sentinela de novos genes de resistência, em populações de patógenos Gram negativos (WYRES; HOLT, 2018). Desde a década de 1990, o número crescente de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos traz grandes desafios à saúde pública global associados à morbidade e mortalidade (LIAO; LIU; ZHANG, 2020).

Para o manejo de BGN resistentes aos carbapenêmicos, os clínicos geralmente recorrem à combinação de antibioticoterapia baseada em polimixinas, aminoglicosídeos e tigeciclina. No entanto, resistência simultânea a carbapenêmicos, aminoglicosídeos, polimixinas e tigeciclina, está sendo cada vez mais relatada em todo o mundo (KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020).

Em termos de frequência, os determinantes mais importantes da resistência aos aminoglicosídeos em BGN são as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs), divididas em três classes: acetiltransferases (AAC), nucleotidiltransferases (ANT) e fosfotransferases (APH). Outros mecanismos que conferem resistência aos aminoglicosídeos incluem efluxo ativo do antimicrobiano, entrada reduzida na célula bacteriana, e produção de várias 16S rRNA metilases (*ArmA*, *RmtB* e *RmtC*) (CIRIT et al., 2019).

Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos (CRE) são cada vez mais reconhecidas como responsáveis por infecções, tanto em hospitais como em instituições de longa permanência. Uma característica típica de CRE, assim como de outros bacilos resistentes aos carbapenêmicos é sua associação com altas taxas de letalidade (GIURAZZA et al., 2021).

1.1.3 Resistência às Polimixinas em *Klebsiella* spp.

Devido ao aumento de infecções por BGN resistentes aos carbapenêmicos, as polimixinas estão sendo cada vez mais utilizadas como

último recurso terapêutico para o tratamento destes patógenos (BAKTHAVATCHALAM et al., 2018; MOFFATT; HARPER; BOYCE, 2019; ZUSMAN et al., 2017).

Na década de 1940, a propriedade antibacteriana da polimixina foi reconhecida e classificada em cinco tipos diferentes (A-B-C-D e E) (SILVA et al., 2022). Destes, somente colistina (polimixina E) e polimixina B foram usadas em ambientes clínicos, por serem consideradas menos nefrotóxicas e neurotóxicas (FALAGAS; KASIAKOU, 2005; LIU et al., 2016; MATAR; AL-REFAI, 2020).

As polimixinas têm sido utilizadas há mais de 50 anos em medicina veterinária e humana. No entanto, o uso sistêmico foi reduzido devido aos consideráveis efeitos adversos de nefrotoxicidade e neurotoxicidade. Recentemente, o interesse clínico em polimixinas sistêmicas retornou devido à crescente incidência de infecções causadas por bactérias multirresistentes (MR) (SILVA et al., 2022) e pelo bom desempenho bactericida contra uma variedade de BGN. No entanto, alguns BGN possuem resistência intrínseca para polimixinas, entre eles: *Serratia marcescens*, *Proteus* spp; *Providencia* spp; *Morganella morganii*, *Vibrio cholerae*, *Brucella* spp; *Campylobacter* spp; *Legionella* spp; *Chromobacterium* spp; *Edwardsiella* spp; *Burkholderia cepacia*, *Neisseria meningitidis*, também algumas espécies de *Aeromonas*, além de cocos Gram positivos (AHMED et al., 2020; BAKTHAVATCHALAM et al., 2018; MOFFATT; HARPER; BOYCE, 2019).

Os antibióticos polipeptídicos catiônicos são moléculas de estrutura química grande, que consistem em um heptapeptídeo cíclico ligado a um tripeptídeo acilado no N-terminal por uma cadeia de ácido graxo de comprimento variável (RODRÍGUEZ-SANTIAGO et al., 2021). Tanto a colistina quanto a polimixina B diferem apenas por um aminoácido entre si e compartilham o mesmo mecanismo de ação (FALAGAS; KASIAKOU, 2005; LIU et al., 2016; MATAR; AL-REFAI, 2020).

A atividade antibacteriana das polimixinas baseia-se na interação eletrostática entre o polipeptídeo catiônico e porções carregadas negativamente, presentes no lípido A do lipopolissacarídeo (LPS), que formam a membrana externa de BGN (ESPOSITO et al., 2017). Uma das principais funções da membrana externa é atuar como uma barreira de permeabilidade

contra diversos agentes nocivos, incluindo diferentes antimicrobianos. O papel protetor da membrana externa está relacionado principalmente com a presença do LPS na superfície da célula, o que dificulta a penetração de antibióticos hidrofóbicos e/ou grandes (AHMED et al., 2020). O LPS é constituído por três partes: o lipídio A, ancorado na membrana externa; o antígeno O, que é altamente variável sendo o componente mais externo do LPS; e o polissacarídeo conectando o lipídio A ao antígeno-O (LI et al., 2014).

A ligação das polimixinas ao LPS consiste na interação entre os resíduos altamente básicos de diaminobutírico (Dab) e os fosfodiésteres de LPS, bem como interações hidrofóbicas entre a cadeia lateral de 6-metiloctanoil e a bicamada lipídica da membrana externa ou cadeia acil graxa ligada ao LPS. A ligação desestabiliza o conjunto de LPS, resultando na desestabilização e ruptura da membrana da camada externa, com consequente vazamento citoplasmático e morte celular (BAKTHAVATCHALAM et al., 2018; RODRÍGUEZ-SANTIAGO et al., 2021; SRINIVAS; RIVARD, 2017).

O uso extensivo de colistina como aditivo alimentar para porcos e aves, juntamente com seu uso inapropriado na clínica médica, levou o surgimento de reservatórios de altos níveis de resistência em BGN, como em *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (SILVA et al., 2022; TAN et al., 2019).

Os patógenos Gram negativos naturalmente sensíveis às polimixinas, podem adquirir mutações nas vias celulares que levam à modificação do LPS, resultando em resistência a estes fármacos. A modificação ocorre principalmente por meio da adição de moléculas catiônicas, 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N), e fosfoetanolamina (PEtN) aos componentes do lipídeo A ou do ácido 3-desoxi-Dmanno-octulosônico (Kdo). Estas modificações se devem a alterações cromossômicas, portanto, esta resistência não é gerada por transferência horizontal de genes entre espécies de bactérias (AH; KIM; LEE, 2014; DOI; VAN DUIN, 2020; ESPOSITO et al., 2017; MOHAPATRA; DWIBEDY; PADHY, 2021; NANG et al., 2021; SRINIVAS; RIVARD, 2017). Os operons *arnBCADTEF* (também conhecidos como *pmrHFIJKLM*) e *pmrE*, são regulados por uma via de dois sistemas componentes (TCs), *PhoP / PhoQ* e *PmrA / PmrB*. A ativação dos (TCs) *PhoP / PhoQ* levam à ativação do *pmrD*, que por sua vez ativa *PmrA/PmrB*. Os TCs *PmrA/PmrB* regulam os operons

arnBCADTEF e *pmrE* para sintetizar L-Ara4N para adição ao LPS (SRINIVAS; RIVARD, 2017).

Os mecanismos de resistência associados às polimixinas podem ser diferentes em distintos gêneros bacterianos, mas na maioria das vezes segue sempre a via comum de modificação do lipídio A, com adição de l-ara4N e / ou pEtN (SILVA et al., 2022).

Em *K. pneumoniae*, a resistência às polimixinas é induzida por compostos catiônicos como polimixinas onde, estímulos ambientais, como baixas concentrações de Mg^{2+} , pH ácido e altas concentrações de Fe^{3+} , ativam os dois sistemas componentes (TCs) *PhoPQ* e/ou *PmrAB*. A ativação subsequente do operon *arnBCADTEF*, do gene *eptA* ou o gene *pmrC* desencadeia a síntese e adição de l-Ara4N e pEtN ao lipídio A, respectivamente. O TC *PmrAB* também é ativado pelo *PhoPQ* através do produto do gene *pmrD*, além disso, o operon *arnBCADTEF* pode ser ativado diretamente por *PhoP* (YANG et al., 2020).

Várias evidências mostram a importância do gene *mgrB*, que é o mecanismo mais frequente de resistência às polimixinas relatado em *K. pneumoniae*. Este gene codifica uma pequena proteína transmembrana reguladora, além disso, regula negativamente a atividade da enzima quinase de *PhoQ*, cuja inativação aumenta a resistência às polimixinas. Independente do mecanismo genético que conduz à inativação do gene *mgrB*, uma cascata de fosforilação *PhoQ*, *PhoP*, *PmrD* e/ou *PmrAB* é ativada, o que finalmente desencadeia a expressão do operon *arnBCADTEF* e modificação do LPS (NANG et al., 2021; SILVA et al., 2022; SRINIVAS; RIVARD, 2017).

Por outro lado, os altos níveis de concentração inibitória mínima (CIM) de colistina, produzidas por cepas portadoras de mutações nos genes *phoPQ*, *pmrAB* ou *mgrB*, sugerem que outros *locus* genéticos estão envolvidos na resistência. No entanto, os genes *crrAB* que codificam estas proteínas não estão presentes em todos os genomas de *K. pneumoniae* e estão ausentes em *E. coli*. Esses achados reforçam a hipótese de que as vias ou mecanismos específicos dos isolados podem estar envolvidos na resistência às polimixinas (AHMED et al., 2020; MCCONVILLE et al., 2020; MOFFATT; HARPER; BOYCE, 2019; YANG et al., 2020).

As polimixinas são comumente utilizadas em hospitais brasileiros para tratar infecções causadas por patógenos Gram negativos MR. Este uso foi associado com um aumento na prevalência de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e às polimixinas (KpnCRPR), que passou de 1,8% em 2009, para 15% em 2013 e 35,5% em 2015 (DA SILVA et al., 2020).

Até 2015, a resistência às polimixinas se devia às mutações nos genes codificados nos cromossomos, no entanto, no final daquele ano, Liu e seus colaboradores descreveram, em cepas de *E. coli*, isoladas de carnes de animais e pacientes da China, um gene que confere resistência à colistina mediada por plasmídeo *mediated colistin resistance (mcr-1)* (LIU et al., 2016; NANG et al., 2020), localizado em um plasmídeo da família *Incl2* pHNSHP451 (VALIAKOS; KAPNA, 2021; ZOU et al., 2015). O gene *mcr-1* codifica a enzima fosfoetanolamina transferase que adiciona PETN ao lipídio A. Esta modificação reduz a carga negativa do LPS e, portanto, evita a interação com a polimixina (BAKTHAVATCHALAM et al., 2018; RODRÍGUEZ-SANTIAGO et al., 2021).

Em 2016, esse gene foi detectado em cinco continentes, entre Enterobacterales e inúmeras outras espécies, em associação com vários plasmídeos distintos, por isso, a disseminação desse gene é considerada uma preocupante ameaça global a saúde pública (LIU et al., 2016; WANG et al., 2019; WYRES; HOLT, 2018).

Até o momento, dez outros genes *mcr* foram descritos. A família *mcr* consiste em dez lipídeos A, que são membros da fosfoetanolamina transferase (de *mcr-1* a *mcr-10*) (LIU et al., 2022b; WANG; FENG; ZONG, 2023; YIN et al., 2022). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. Acesso em abril. 2023. Entretanto, o *mcr-1* é o gene predominante em todo o mundo (BOUEROY et al., 2022; HUSSEIN et al., 2021).

Desde a primeira descrição do gene *mcr-1* na China, vários estudos de vigilância relataram a identificação de Enterobacterales produtoras de *mcr-1* de diversas fontes, incluindo amostras de alimentos, animais e humanos. Contudo, a grande maioria desses relatos estão concentrados na Europa e na Ásia (ELBEDIWI et al., 2019; WANG et al., 2018).

O gene *mcr-1* foi descrito em isolados de infecções em pessoas com histórico de viagem ao México, Colômbia, Peru, Bolívia e República Dominicana (HENIG et al., 2019). Em estudos realizados por Fernandez e

colaboradores (2016), isolados de *E. coli* com o gene *mcr-1* foram encontrados em carnes de frango importadas do Brasil. Essas descobertas sugerem que a América Latina e o Caribe poderiam ser reservatórios para a disseminação deste gene. Da mesma forma, analisa-se que os isolados de Enterobacterales produtores de *mcr-1* foram subestimados na América do Sul, porque a susceptibilidade às polimixinas não são testadas rotineiramente e, em muitos casos, este teste é reservado para isolados resistentes aos carbapenêmicos. Entretanto, isolados transportando o gene *mcr-1* podem ser encontrados em microrganismos susceptíveis à polimixina (CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$), subestimando a detecção deste gene (FERNANDES et al., 2016).

Além do *mcr-1*, isolados de Enterobacterales que abrigam os genes *mcr-3*, *mcr-5* e *mcr-9* foram relatados na Argentina, Brasil, Paraguai, Canadá, Colômbia e EUA (RHOUMA et al., 2019). Também, uma publicação do Brasil, realizado na cidade de Guarujá-SP, relatou a presença do gene *mcr-4* em amostras de areia de praia (FURLAN et al., 2020). Dados publicados mostram que *E. coli* e *Salmonella* entérica, portadoras dos genes *mcr-3* e *mcr-5* foram relatadas nas Américas, principalmente de origem humana. Por outro lado, o gene *mcr-9* tem sido amplamente relatado nos EUA (com casos esporádicos no Brasil, Argentina e México). No entanto, a maioria desses isolados apresentando estes genes são sensíveis às polimixinas, não sendo detectado laboratorialmente, o que indica que a relevância clínica pode estar subestimada (RODRÍGUEZ-SANTIAGO et al., 2021).

1.2 *Providencia stuartii*

Providencia é um BGN que pertence à ordem Enterobacterales da família Morganellaceae (RUS et al., 2022). O gênero *Providencia* inclui cinco espécies: *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia heimbachae* e *Providencia rustigiani* (LIU; WANG; FANG, 2020). Entretanto, *P. rettgeri* e *P. stuartii* são as espécies mais comuns de causar infecções hospitalares (IWATA et al., 2020). Notavelmente, *P. stuartii* é um microrganismo oportunista que causa infecções relacionadas à assistência à saúde, como infecção entérica aguda, do trato urinário e pulmonar. Infecções por *P. stuartii* são difíceis de tratar e estão frequentemente envolvidas em

surtos hospitalares, particularmente em lares de idosos, unidades de queimaduras e de cuidados intensivos (LIU; WANG; FANG, 2020).

1.2.1 Principais Mecanismos de Resistência Encontrados em *P. stuartii*

Estudos recentes de vários países comprovaram o surgimento de isolados de espécies de *Providencia* MR a diversos antimicrobianos e demonstraram a capacidade de se disseminar entre pacientes em ambientes hospitalares, provocando surtos com elevados desafios de tratamento e complicações (CHEN et al., 2022; RAKOV et al., 2021). As infecções por *P. stuartii* são difíceis de controlar e têm impactos substanciais na morbidade, mortalidade, tratamento e custos de gerenciamento do paciente (MOLNÁR et al., 2019).

Providencia spp. possui vários genes de resistência, como *ampC* e determinantes genéticos mediados por plasmídeos, como genes codificados de ESBL e carbapenemases. No entanto, também apresentam resistência intrínseca a aminopenicilinas, cefalosporinas de 1^a, 2^a e 3^a geração, aminoglicosídeos (gentamicina), colistina e tigeciclina. Além disso, *P. stuartii* pode formar comunidades bacterianas que facilitam a adesão e a produção de biofilme levando a infecções persistentes (RAKOV et al., 2021).

Os genes codificadores de Blac do tipo *ampC*, são comumente encontrados nos cromossomos de vários membros da família de Enterobacterales, como *Enterobacter* spp. e algumas bactérias não fermentadoras, como *P. aeruginosa*. A hiperprodução de *ampC* fornece a esses patógenos resistência à penicilina, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos, bem como carbapenêmicos, concomitante com alteração de porina. Estes isolados produtores de *ampC* são problemáticos, porque se tornam resistentes durante a terapia antimicrobiana (ITO et al., 2018). Embora o nível de expressão do gene AmpC seja geralmente baixa, pode ser induzido pela administração de antibióticos como penicilina ou ácido clavulânico e pode induzir resistência aos carbapenêmicos quando expresso em grandes quantidades (SAWA; KOOGUCHI; MORIYAMA, 2020).

P. stuartii é intrinsecamente resistente à colistina e tigeciclina, mas não aos carbapênêmicos, no entanto a resistência a esta classe de antimicrobiano é

cada vez mais relatada em todo o mundo, principalmente devido ao surgimento do gene NDM-1 (HOARD et al., 2020).

O microrganismo portador do gene de resistência MBL, do tipo NDM-1, é considerado um novo tipo de “superbactéria”. Esse gene foi descoberto pela primeira vez na Índia e se espalhou pelo mundo. É capaz de hidrolisar quase todos os antimicrobianos β -lactâmicos, levando ao surgimento de bactérias MR (WANG et al., 2021). Atualmente, o gene NDM é predominante em *K. pneumoniae* e *E. coli* (MENDES et al., 2022).

Os centros ativos das enzimas da classe B de Ambler são íons metálicos (principalmente Zn^{2+}). Com base na homologia das sequências, as MBL são divididas em três subclasses: B1, B2 e B3 (WANG et al., 2021). As subclasses B1 e B3 possuem dois íons de zinco no sítio ativo e são consideradas enzimas que inibem amplo espectro de antimicrobianos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. A subclasse B2 tem um íon de zinco no sítio ativo, e exibe um perfil de espectro de inibição estreito de antimicrobiano, incluindo carbapenêmicos, mas não penicilinas e cefalosporinas. Algumas MBLs pertencem à subclasse B2, incluindo CphA de *Aeromonas hydrophila*, Sfh-1 de *Serratia fonticola* e ImiS de *Aeromonas veronii*. Da mesma forma, MBL da subclasse B3 foram identificadas, como L1 de *Stenotrophomonas maltophilia*, AIM-1 de *Pseudomonas aeruginosa* e GOB-1 de *Elizabethkingia meningoseptica* (anteriormente *Chryseobacterium septicum*) (WU et al., 2019).

A maioria das MBL que foram identificadas até agora pertencem à subclasse B1. As três MBL mais comuns da subclasse B1, encontradas em isolados clínicos, são: IMP, VIM e NDM. Os genes codificados são em grande parte disseminados por plasmídeos e podem ser transferidos entre cepas bacterianas por transposons. São facilmente disseminados entre as Enterobacterales por conjugação, o que permitiu a rápida disseminação mundial (FALCONE et al., 2021; WANG et al., 2021).

A NDM-1 pode hidrolisar quase todos os antimicrobianos betalactâmicos, exceto aztreonam (ALFEI; SCHITO, 2022). Estudos sugerem que a maioria dos plasmídeos contendo *bla*NDM também transportam outros determinantes de resistência que codificam diferentes Blac, também genes de resistência às quinolonas e o gene 16S rRNAmetilases, que confere resistência aos aminoglicosídeos (PÉREZ-GRACIA, 2019; WU et al., 2019).

Após o primeiro relato de *bla*NDM, outras 41 variantes foram identificadas em numerosas espécies de Enterobacteriaceae (MA et al., 2023). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. Acesso em abril. 2023.

Surtos graves causados por Enterobacterales produtoras de NDM estão sendo descritos na China, Índia, Paquistão e Bangladesh, limitando assim o uso dos carbapenêmicos (AYOUB MOUBARECK; HAMMOUDI HALAT, 2022).

1.3 COINFECCÕES OU INFECCÕES SECUNDÁRIAS CAUSADAS POR SARS-CoV-2

As coinfeccões e/ou superinfecções são comuns em muitas infecções respiratórias e virais. Embora vários agentes microbianos possam causar infecções agudas do trato respiratório inferior, na maioria dos casos, a doença ocorre, concomitantemente, por vírus e bactérias (MIRZAEI et al., 2020; SEGALA et al., 2021). As infecções secundárias, após as doenças virais, são frequentes e podem levar a resultados inesperados. Em epidemias anteriores de influenza, por exemplo, muitas mortes ocorreram devido o resultado direto de coinfeccões por bactérias (KUMAR et al., 2021). Desde os primeiros dias do surto de Síndrome Respiratória Aguda Grave do coronavírus 2 (SARS-CoV-2), foram suspeitos os risco de coinfeccões ou infecções secundárias por bactérias e/ou fungos durante a pandemia de COVID-19 (SEGALA et al., 2021).

Os pacientes vulneráveis a infecções pulmonares virais, como influenza, síndrome respiratória aguda (SARS) possuem maior risco de serem coinfectados por bactérias MR (BENGOCHEA; BAMFORD, 2020). As coinfeccões secundárias bacterianas em pandemias e/ou epidemias virais têm consequências irreversíveis, especialmente em grupos de alto risco, incluindo aqueles com imunodeficiência ou imunossupressão (MACINTYRE; BUI, 2017; MIRZAEI et al., 2020). Sabe-se que as infecções virais podem enfraquecer a imunidade do hospedeiro, favorecendo o desenvolvimento de infecções bacterianas (ALMAND; MOORE; JAYKUS, 2017). O novo vírus da síndrome respiratória aguda grave SARS-CoV-2 é um exemplo, sendo que, a maioria dos pacientes hospitalizados com essa doença, adquiriram uma infecção bacteriana secundária (TETRO, 2020).

Nas formas graves de COVID-19, os pacientes exibem níveis aumentados de biomarcadores e citocinas inflamatórias, relacionados à infecção, sugerindo potencial coinfeção bacteriana como resultado da alteração do sistema imunológico (ZHANG et al., 2020).

As coinfeções prejudicam a melhora clínica e aumentam a gravidade da COVID-19, devido à colonização e fixação de bactérias ao tecido do hospedeiro. As infecções combinadas (vírus e bactérias) resultam no aumento da destruição tecidual, facilitando a disseminação sistêmica do vírus e/ou copatógenos bacterianos (BENGOCHEA; BAMFORD, 2020).

Alguns estudos mostram que infecções secundárias diminuem significativamente a sobrevivência de pacientes com COVID-19, particularmente quando foram internados em UTI (BENGOCHEA; BAMFORD, 2020; HOQUE et al., 2021; LANFRANCO FATTORINI, ROBERTA CRETINI, 2020).

1.4 AUMENTO DO CONSUMO DE ANTIBIÓTICOS NA PANDEMIA DE COVID-19

O aparecimento e a subsequente pandemia causada por doenças respiratórias agudas graves, como o novo vírus SARS-CoV-2, exigiu grandes ajustes para os sistemas e estruturas de saúde. Os programas de controle de infecção e de administração antimicrobiana tiveram que se adaptar rapidamente em tempo real, diante de uma emergência que surpreendeu o mundo inteiro, no início de 2020 (RAWSON et al., 2020).

Para combater esta crise global, as autoridades de saúde desenvolveram e implementaram inúmeras medidas de controle e prevenção de infecções, incluindo uso de máscara, boa higiene das mãos, distanciamento social, rápida instalação de hospitais especiais e estratégias de confinamento. Essas medidas excessivas de gerenciamento em resposta a COVID-19 trouxeram benefícios adicionais em termos de redução de outras infecções (LAI et al., 2021).

Durante a pandemia de COVID-19, foi necessário o aumento do uso de agentes antimicrobianos em relação aos anos anteriores (CHEN et al., 2020). No geral, mais da metade dos pacientes com COVID-19 são tratados com antibióticos, e esse número pode ser maior em pacientes com doenças graves (LAI et al., 2021).

Os antimicrobianos tiveram importantes contribuições no gerenciamento da COVID-19 (GAUTRET et al., 2020), sendo fundamentais para o tratamento de infecções bacterianas e de coinfeções respiratórias, e foram administrados de forma empírica ou direcionados em pacientes que apresentavam suspeita ou confirmação de infecção bacteriana (RAWSON et al., 2020).

Em outubro de 2020, a *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID), publicou diretrizes sobre o uso adequado de antibióticos na COVID-19, que ratificaram a recomendação da diretriz da Campanha de Sobrevivência à Sepse de 2020 sobre a COVID-19, para tratar pacientes gravemente enfermos, internados em UTI por COVID-19, com antibioticoterapia empírica, enquanto aguardava os resultados dos exames. No entanto, mesmo quando os antimicrobianos são administrados empiricamente, as prescrições devem ser avaliadas diariamente para descalonamento, considerando o estado clínico do paciente e os resultados laboratoriais (SEGALA et al., 2021). Entretanto, pode ser difícil fornecer um esquema terapêutico empírico adequado para cada paciente, dada a grande variedade de infecções que podem estar presentes. A orientação geral é que o protocolo de tratamento empírico de antimicrobianos deve ser escolhido com base no(s) microrganismo(s) suspeito(s) de acordo com os padrões de sensibilidade aos medicamentos (BUCKMAN; TURNBULL; MAZUSKI, 2018).

Os protocolos precoce de antibioticoterapia, estão associados a melhores resultados (VAZQUEZ-GUILLAMET et al., 2014), mas por outro lado, o uso excessivo de terapia de amplo espectro também pode causar danos ao selecionar bactérias resistentes aos antimicrobianos, aumentando o risco de eventos adversos, como infecções por *Clostridioides difficile*, além do aumento dos custos com a internação hospitalar (TESHOME et al., 2019).

Estudos recentes descreveram um aumento de organismos MR durante a pandemia do COVID-19 (LAI et al., 2021; WU; CHEN; ZHU, 2020). Com a continuidade da pandemia, prevê-se um aumento significativo de resistência antimicrobiana pelo uso excessivo de antibióticos em pacientes com COVID-19. Isso tem consequências importantes em ambientes hospitalares com alta prevalência de isolados MR, levando a um aumento na mortalidade devido ao limitado arsenal de antibióticos para tratar infecções hospitalares (BENGOCHEA; BAMFORD, 2020).

2 JUSTIFICATIVA

Diante da relevância clínica de bactérias resistentes aos antimicrobianos, estudos são necessários para compreender a epidemiologia local e propor melhorias nos protocolos de prevenção e tratamento destas infecções. Além disso, avaliar a correlação genética entre as cepas de *K. pneumoniae* e entre as cepas de *P. stuartii*, observando a dinâmica da disseminação dos genes de resistência, poderão auxiliar na adoção de medidas essenciais no controle de resistência aos antimicrobianos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil fenotípico, genotípico e epidemiológico de isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos/polimixinas de ICS, no período de 2015 a 2020, e *P. stuartii* resistentes aos carbapenêmicos, identificados de pacientes internados no Hospital Universitário de Londrina (HU-UDEL), durante a pandemia de COVID-19.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 *K. pneumoniae*

- Determinar os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de ICS de KpnCRPR no período de 2015 a 2020;
- Caracterizar por testes fenotípicos a produção de carbapenemases em isolados de ICS de KpnCRPR;

- Avaliar a similaridade genética dos diferentes isolados de KpnCRPR recuperados de ICS;
- Analisar por testes estatísticos a associação dos diversos dados demográficos e clínicos dos pacientes do estudo;
- Pesquisar, através do sequenciamento do DNA genômico, genes de resistência dos isolados de ICS de KpnCRPR.

3.2.2 *P. stuartii*

- Determinar os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de *P. stuartii* de diferentes materiais clínicos, no período de 04/2021 a 09/2021;
- Caracterizar por testes fenotípicos a produção de carbapenemases de *P. stuartii* de diversos materiais clínicos;
- Analisar por testes estatísticos a associação dos diversos dados demográficos e clínicos dos pacientes do estudo;
- Relacionar a similaridade genética dos isolados de *P. stuartii*;
- Pesquisar, através do sequenciamento do DNA genômico, genes de resistência dos isolados de ICS de KpnCRPR.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO DE *K. PNEUMONIAE*

Foi realizado um estudo transversal retrospectivo e descritivo.

4.1.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo 44 isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e polimixinas de ICS, caracterizadas de acordo com CDC, no período de janeiro de 2015 a dezembro de 2020. Foram considerados para

este estudo os pacientes internados com mais de 48 horas de admissão no HU-UEL, e somente um isolado por paciente.

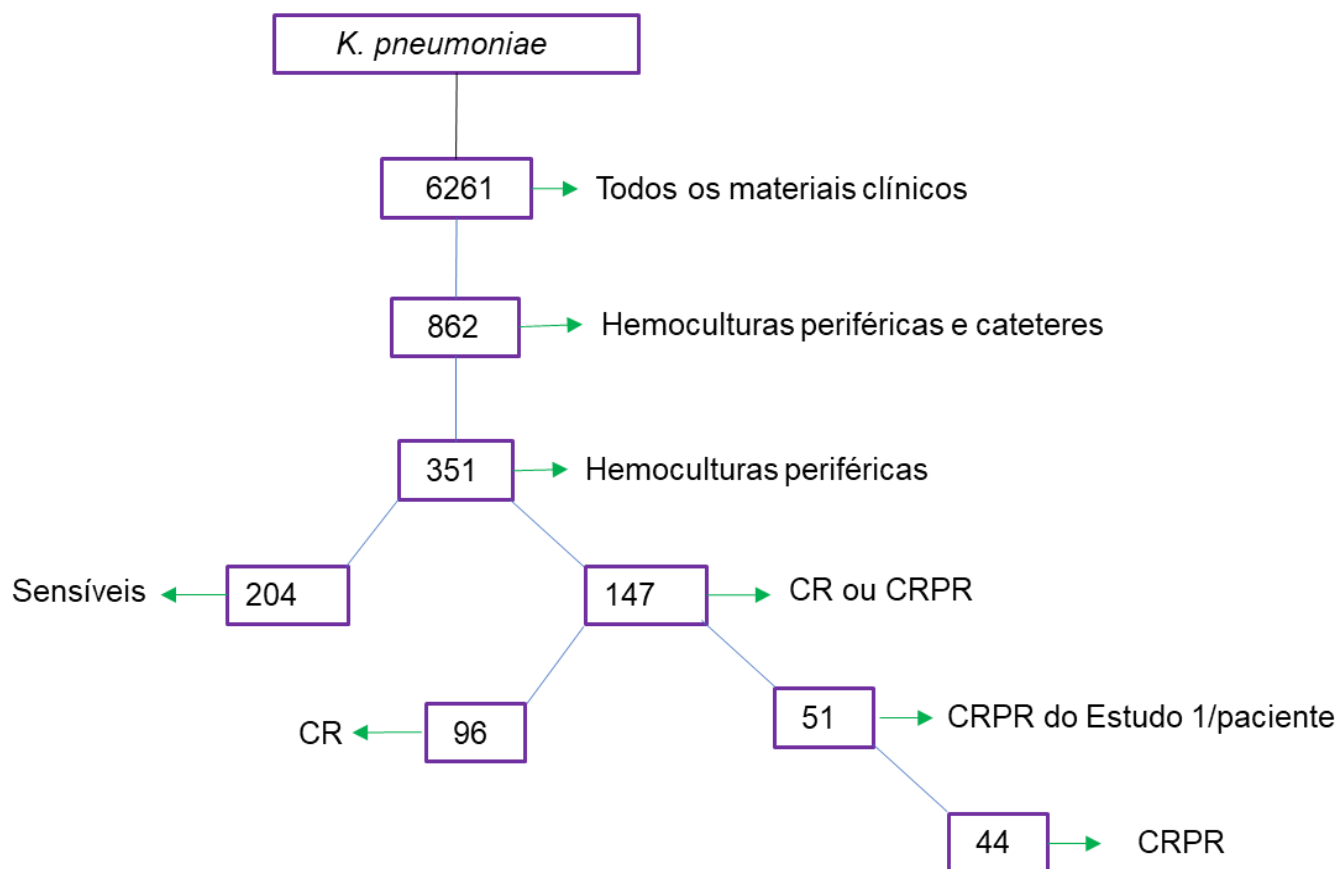
4.1.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo amostras de hemocultura, do mesmo paciente, em duplicata, hemocultura de via cateter, isolados que não apresentaram resistência aos carbapenêmicos e às polimixinas, isolados que perderam a resistência aos antimicrobianos após período de armazenamento, ou de pacientes cujos prontuários não foram localizados ou com informações incompletas.

4.1.3 Identificação das Amostras

Após a positividade das hemoculturas de sangue periférico pelo aparelho Bactec™ (BD), foram realizadas coloração de Gram e semeaduras em meios de ágar sangue, ágar chocolate, ágar Mac Conkey e ágar cromogênico. As identificações dos microrganismos e os padrões de sensibilidade aos antimicrobianos, foram determinados pelo sistema automatizado VITEK2® (bioMérieux) utilizando os painéis GN ID e AST 239, de acordo com a orientação do fabricante e a interpretação foi realizada seguindo os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), de 2021. 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.

Figura 1- Número de *K. pneumoniae* identificadas, no período de 2015 a 2020 de pacientes internados no HU-UEL.



4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO DE *P. STUARTII*

Foi realizado estudo transversal retrospectivo e descrito.

4.2.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos neste estudo 21 isolados clínicos de *P. stuartii* resistentes aos carbapenêmicos, identificados de diferentes materiais clínicos, de pacientes do HU-UEL, no período de 04/2021 até 09/2021. As amostras foram identificadas pelo sistema automatizado Vitek2® bioMérieux, com o uso do cartão do GN ID e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos, com cartões AST 238 e AST 239. A interpretação foi realizada de acordo com os critérios do CLSI 2021. Foram incluídos neste estudo uma amostra por paciente.

4.3 COLETA DE DADOS

Foram coletados dados demográficos e clínicos dos pacientes estudados, incluindo idade, gênero, comorbidades e uso de antibióticos dos prontuários médicos, cedidos para consulta pelo Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do HU-UEL e também através do prontuário médico eletrônico, do sistema de informática MedView do HU-UEL. Os estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina CAAE 56869816.0.0000.5231.

4.4 TESTES FENOTÍPICOS

4.4.1 mCIM – Modified Carbapenem Inactivation Method

Foi realizada uma suspensão utilizando 1 alçada de 1µl da bactéria em 2 mL do caldo de soja e tripticaseína (TSB). Após, homogeneizar em vórtex ou de maneira vigorosa manualmente por 10-15 segundos. Foi introduzido um disco de meropenem 10 µg na suspensão e incubado por 4h.

Em outro frasco foi preparada uma suspensão 0,5 Mc Farland de *E. coli* ATCC 25922 e plaqueada em ágar Muller Hinton (MHA). A seguir, foi retirado o disco de meropenem e aplicado na placa de MHA.

Interpretação dos resultados:

mCIM Positivo: Presença de carbapenemase do tipo serina ou MBL. Halo de 6-15mm ou presença de pequenas colônias (pinpoint) dentro da zona de 16- 18mm ou ausência de inibição de crescimento.

mCIM Negativo: Halo limpo \geq 19mm, sem pinpoints.

4.4.2 eCIM - EDTA – Carbapenem Inactivation Method

Foi realizada uma suspensão utilizando 1 alçada de 1µl da bactéria em 2 mL do caldo de soja e tripticaseína (TSB) e adicionado 20 µl de EDTA. Após, homogeneizado, em vórtex ou de maneira vigorosa manualmente, por 10-15 segundos. Foi introduzido um disco de meropenem 10 µg na suspensão e incubado por 4h.

Em outro frasco foi preparada uma suspensão 0,5 Mc Farland com *E. coli* ATCC 25922 e plaqueada em ágar Muller Hinton (MHA). A seguir, foi retirado o disco de meropenem e aplicado na placada de MHA.

Interpretação dos resultados:

eCIM Positivo: Presença de carbapenemase do tipo MBL. Interpretar apenas quando mCIM positivo. Um aumento ≥ 5 mm no diâmetro da zona para eCIM vs diâmetro da zona para mCIM (por exemplo, mCIM = 6 mm; eCIM = 15 mm; diferença de diâmetro = 9 mm). Apenas para o teste eCIM, ignore as colônias localizadas dentro de qualquer zona de inibição. A presença de colônias pinpoints no eCIM não devem ser consideradas.

4.4.3 Teste de Diluição em Ágar Colispot e Polispor (Teste da “Gota”)

Preparo da solução mãe de colistina e polimixina B: Foi preparada uma solução do fármaco na concentração de interesse (128 μ /mL), pesquisado a potência no laudo de análise do lote fornecido pelo fabricante para a pesagem e uso de solvente e diluente conforme especificação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Preparo da solução de colistina ou polimixina B com concentração de 4.0 μ g/mL: Foi adicionado 0,250 mL de Solução mãe em 7,750 mL e MHB cátion ajustado.

Preparo da bactéria: Foi feito uma suspensão das colônias de bactéria em 3 mL de salina estéril (0,9%), na escala 0,5 de McFarland. A suspensão foi espalhada em toda superfície de uma placa de Petri, contendo meio de MHA, com auxílio de um *swab* alginatado. Após, foram dispensados 10 μ L de colistina e polimixina, nas concentrações de 4 μ g/mL e incubadas a 35°C +/- 2°C por 18 a 24 h.

Interpretação dos resultados:

O resultado negativo foi definido quando houve inibição do crescimento de colônia de bactéria dentro do local que foi aplicado a gota da colistina ou polimixina.

O resultado positivo foi definido quando houve desenvolvimento de colônia de bactéria dentro do local que foi aplicado a gota da colistina ou polimixina.

4.4.4 Microdiluição em Caldo

Foi preparada a solução da droga na concentração de interesse (128 µg/mL), sendo que a quantidade a ser pesada é de acordo com a potência do fármaco fornecido pelo laudo do fabricante. Como solvente e diluente, foi utilizado água ultrapura, e preparado de acordo com as instruções do (CLSI).

Os testes foram realizados em placas de poliestireno e/ou polipropileno: com a pipeta multicanal, foram preenchidos os poços da microplaca com 50 µL do meio de CAMHA, partindo da segunda coluna até a última. A primeira coluna da microplaca é preenchida com 100 µL da droga diluída utilizando micropipeta. Com o auxílio da pipeta multicanal, foi transferido 50 µL da primeira para a segunda coluna, homogeneizando três vezes, transferindo 50 µL da segunda para a terceira coluna e assim por diante até o fim da placa, pulando a coluna de controle de crescimento (CC), desprezando os 50 µL do conteúdo na última coluna, que é do controle de esterilidade (CE).

As amostras foram preparadas utilizando a escala de 0,5 de McFarland, em salina. Em seguida foi adicionado 25 µL da amostra ajustada em um tubo Falcon contendo 2475 µL de Caldo Muller-Hinton Cátion Ajustado (CAMHA). Foi pipetado 50 µL da amostra em toda a linha da placa menos no orifício CE. Após, a placa foi incubada à 37°C por 18 a 24h. As ATCC, *E. coli* 25922 e *P. aeruginosa* 27853 foram utilizadas como controle do teste.

A CIM foi definida como a menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento do microorganismo.

Utilizou-se 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).

4.4.5 Polimixina NP (Nordman/Poirel)

O teste de Polimixina NP (Pol NP) foi realizado conforme descrito por Poirel et al. (2015).

Preparo das Soluções:

Solução NP (solução estoque): foi adicionado 225 mL de água destilada 6,25g de CAMHA e 0,0125g de vermelho de fenol. Corrigindo o pH para 6,7 utilizando HCl 1N. Essa solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos (depois da autoclavagem, o volume da solução foi acertado para 225 mL utilizando água destilada). Em temperatura ambiente, foi adicionado 25 mL de solução de glicose a 10%.

Solução de Polimixina B (estoque mãe): Para a pesagem da polimixina foi pesquisado a potência no laudo de análise do lote que é fornecido pelo fabricante e após diluída em 5 ml de solução de CAMHA. Depois foi fracionada em tubos de vidro e armazenada a -70°C.

Solução de NP com Polimixina B: 4 mL de Solução de NP estoque foi adicionado a 100 mL da Solução de Polimixina B.

Preparo da bactéria: As colônias de bactérias foram dissolvidas em 3 mL de salina estéril (0,9%) ajustando a concentração entre 3,0 e 3,5 na escala de McFarland.

Para cada teste foi necessário adicionar 0,150mL de solução NP e 0,050 mL da suspensão da bactéria para análise, assim também para os controles negativo e positivo.

A leitura dos resultados do teste rápido de Pol NP foi realizada após 2 h de incubação a 35 ± 2 ° C.

A microplaca foi incubada em estufa bacteriológica 35 ± 2 °C, e posteriormente, a leitura foi realizada em dois momentos: 2 horas e 4 horas. O teste foi considerado positivo quando foi observada uma mudança na coloração da solução C de laranja para amarelo, indicando que houve crescimento bacteriano na presença do antibiótico em questão. Quando a solução C foi mantida laranja, o teste foi considerado negativo, quando não há crescimento bacteriano na presença de polimixina.

4.5 TESTES GENOTÍPICOS

4.5.1 Extração

A extração do DNA genômico foi realizada pelo kit *Pure Link Genomic* (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante: aproximadamente 1 mL das culturas previamente incubada em caldo TSB, foram centrifugadas a 8.000 RPM por 5 minutos; o precipitado obtido foi ressuspenso em 180 µL de *Pure Link Genomic Digestion Buffer* e 20 µL de *Proteinase K*. Após 2 horas de incubação em termo bloco, a 55 °C, adicionou-se 20 µL de *RNase A*, 200 µL de *Pure Link Genome Lysis/Binding Buffer* e 200 µL de etanol 95-100 %. A suspensão obtida foi transferida para um microtubo com coluna (*Pure Link Genomic Spin Columns*) e centrifugada a 13.000 RPM por 2 minutos. Adicionou-se, separadamente, 500 µL de *Wash Buffer 1* e 2, seguida de centrifugação a 13.000 rpm por 2 e 4 minutos, respectivamente. Por fim, transferiu-se a coluna para eppendorf de 1,5 mL para adicionar 50 µL de *Pure Link Genomic Elution Buffer* e centrifugar a 13.000 rpm por 2 minutos. O DNA purificado obtido foi armazenado em freezer a -20 °C.

4.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras que apresentaram o teste fenotípico positivo para carbapenemases foram submetidas a reação de PCR, para os seguintes genes, *blaKPC*, *blaSPM*, *blaVIM*, *blaGIM*, *blaIMP*, *blaNDM* e *blaOXA-48*. As reações foram submetidas à 94 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 58 °C por 1 minuto. Para a investigação do gene *mcr-1* a reação da PCR foi com temperatura de anelamento 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 *blaOXA-48*, e *mcr-1*. Os *primers* utilizados estão detalhados na tabela 1.

Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados para investigação de genes codificadores de carbapenemases, *mcr-1* e ERIC-PCR.

Enzima	Gene	Sequências (5' – 3') F/R	pb	Referências
GIM	<i>bla_{GIM}</i>	TCGACACACCTTGGTCTGAA AACTTCCAACCTTTGCCATGC	172	Ellington <i>et al.</i> , (2007)
IMP	<i>bla_{IMP}</i>	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC CCAAACYACTASGTTATCT	587	Ellington <i>et al.</i> , (2007)
KPC	<i>bla_{KPC}</i>	ATGTCACTGTATCGCCGTCT TTTTCAGAGCCTTACTGCC	538	Bradford <i>et al.</i> , (2004)
NDM	<i>bla_{NDM}</i>	GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC GGTCGCGAAGCTGAGCACCGCAT	782	Doyle <i>et al.</i> , (2012)
OXA-48	<i>bla_{OXA-48}</i>	GCTTGATCGCCCTCGATT GATTGCTCCGTGGCCGAAA	281	Poirel <i>et al.</i> , (2004)
SPM	<i>bla_{SPM}</i>	AAAATCTGGGTACGCAAACG ACATTATCCGCTGGAACAGG	569	Ellington <i>et al.</i> , (2007)
VIM	<i>bla_{VIM}</i>	GATGGTGTGGTTCGCAT CGAATGCGCAGCACCAG	389	Ellington <i>et al.</i> , (2007)
MCR	<i>mcr-1</i>	CGGTCAGTCCGTTTGTTT CTTGGTCGGTCTGTAGGG	350	Liu <i>et al.</i> (2016)
		AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	-	Versalovic (1991)
ERIC		CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA		

4.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase, Baseada em Sequências Repetitivas Intergênicas em Enterobactérias (ERIC –PCR)

As reações de PCR foram realizadas com os primers ERIC1R (3'CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-5') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), à concentração de 50 pmol, 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, usando o termociclador da Applied Biosystems. O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com tampão TBE (tris base, ácido bórico e EDTA). Ajustou-se o aparelho para 100v e 400mA. A análise foi realizada pela coloração do gel com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualização em transiluminador com lâmpada ultravioleta e posteriormente fotografado para a documentação (L-Pix).

4.5.4 Sequenciamento Completo do Genoma

O kit Nextera XT DNA Library Preparation (Illumina) foi usado, seguindo as instruções do fabricante. Metade do volume dos reagentes na marcação do DNA e incorporação do índice foram testados para otimizar o rendimento do kit. Quando necessário, uma diluição prévia de dscDNA com Tris-HCl pH 7,5–8,5 foi realizada para atingir a concentração necessária de 0,2 ng / µl para iniciar o protocolo Nextera XT. A etapa de limpeza foi realizada com 40 µl (0,8X) de esferas AgencourtAMPure XP (Beckman Coulter) para maximizar a recuperação de fragmentos de 300 bp de tamanho. As bibliotecas foram quantificadas por qPCR com NEBNext Library Quant Kit para Illumina (New England Biolabs) seguindo o protocolo do fabricante. A normalização das bibliotecas foi realizada manualmente diluindo cada uma até a concentração recomendada pelo fabricante. O sequenciamento foi realizado em três execuções independentes, o primeiro em uma plataforma MiSeq e os próximos dois em um NextSeq 500. Um total de 23 bibliotecas foram agrupadas equimolarmente e foram carregadas em um MiSeq Reagent Kit v2 de 500 ciclos (Illumina) e um par o sequenciamento final (2 × 250 bp) foi realizado. Um total de 40 e 80 bibliotecas foram agrupadas equimolarmente em duas execuções independentes e foram carregadas em kits de reagentes NextSeq v2 (Illumina) de 300 ciclos de produção média (2x150 bp).

4.5.5 Análises de Bioinformática

O controle de qualidade do genoma e as montagens foram realizadas pelo CLC Genomics Workbench versão 7.0 (Aarhus, Dinamarca). O tipo de

sequência multilocus (MLST), resistome e virulome foram identificados usando MLST v2.0 (Larsen et al., 2012), ResFinder v3.1 (Bortolaia et al., 2020), Virulence Finder v2.0, (Joensen et al., 2014), Plasmid Finder v2.1 (Carattoli et al., 2014), Fim Typer v1.0 (Roer et al., 2017) e Serotype Finder v.2.0 (Joensen et al., 2015), respectivamente. O banco de dados BacMet (Pal et al., 2013) foi usado para identificar biocidas e metais pesados (HM). O EnteroBase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) foi usado para criar um projeto de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) para cepas que apresentassem os mesmos STs, cujos genomas foram alinhados contra genomas obtidos em outros estudos brasileiros.

5 RESULTADOS

Os resultados deste estudo estão apresentados em dois artigos:

5.3 MOLECULAR CHARACTERIZATION OF POLYMYXIN-RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ISOLATED FROM BLOODSTREAM INFECTION OF PATIENTS ADMITTED TO A HOSPITAL IN SOUTHERN BRAZIL

5.2 NEW DELHI METALOBETALACTAMASE (NDM) OF *PROVIDENCIA STUARTII* ISOLATED DURING THE COVID-19 PANDEMIC IN A HOSPITAL IN SOUTHERN BRAZIL

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF POLYMYXIN-RESISTANT
KLEBSIELLA PNEUMONIAE ISOLATED FROM BLOODSTREAM INFECTION
 OF PATIENTS ADMITTED TO A HOSPITAL IN SOUTHERN BRAZIL

Introduction: Colistin/polymyxin regimes represent some of the last options to treat infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. However, the emergence and dissemination of polymyxin-resistant *K. pneumoniae* is increasing worldwide.

Objective: We aimed to investigate the molecular and epidemiological characteristics of resistant to carbapenems and polymyxins of *K. pneumoniae* (KpnCRPR), isolated from bloodstream infection (BSI), circulating in University Hospital in South Brazil (HU-UEL).

Materials and methods: From January 2015 to October 2020, 44 strains of KpnCRPR from BSI were evaluated. Identification and antimicrobial susceptibility tests were evaluated by the Vitek2® automation system. The isolates were sequenced using the NextSeq (Illumina). Bioinformatic analysis evaluated Multilocus sequence type (MLST), resistome and virulome.

Results: The patients presented a mean age of 57.5 years and 29% were male. The prevalent comorbidity was major burned with 18.2%, followed by heart disease 15.9%, surgery 13.6%, sars-Cov-2 and diabetes type-1 both with 11.4%. The Charlson comorbidity index showed that 68.1% of the patients scored greater than 2 points, indicating high risk of hospital death in hospitalizations. Polymyxin was previously used by 72.7% of study patients and was the most commonly used antimicrobial and 59% evolved of the patients died. All isolates were submitted to typing by the MLST technique and it was observed that ST 11 was predominant, followed to a lesser extent by ST 258. Genetic sequencing of the 44 isolates was performed and we found the following resistome genes *blaKPC-2*, *blaCTX-M -2*, *blaCTX-M-14*, *blaCTX-M-15*, *blaOXA-1*, *blaTEM 1D*, *blaSHV-11*, *aac(3)-lia*, *aac(6')lb*, *aac(3)-lid*, *aac(6')-lb-cr*, *sat2*, *strA*, *strB*, *aadA2*, *aph3-la*, *rmtB*, *mphA*, *catA1*, *florR*, *sul1*, *sul2*, *tetA*, *tetD*, *tetG*, *dfrA14*, *dfrA30*, *gyrA/pac* mutation, *mgrB* mutation e *ompK* mutation. And the virulome genes *clb* cluster, *ybtS* cluster, *mrk* cluster, *iutA*, *ybt-1/ICRkp10*, *ybt10/ICEkp4*, *wzy*, K-locus, O-locus, YbST and CbST.

Conclusion: The emergence of colistin resistance was observed in KPC-2 producing *K. pneumoniae* ST 258 and ST11 isolates its suggesting that antimicrobial stewardship and protocols to prevent transmission are needed.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; Carbapenemase; KPC; Virulence; polymyxin-resistant.

INTRODUCTION

Bacterial resistance has become a worldwide problem. The spread of pathogens that are resistance to multiple classes of antibiotics multidrug-resistant (MDR), especially in intensive care units , is a serious problem and challenge for the whole medical community (MĘDRZYCKA-DABROWSKA et al., 2021).

Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (KPCR) has received increasing attention worldwide because of the widespread misuse of carbapenem antibiotics, with KPCR difficult to treat (GONG et al., 2018; YUNGYUEN et al., 2021). Several factors contribute to the development of KPCR resistance, among which carbapenemase-producing enzymes are the most predominant resistance mechanism (CONTE et al., 2016; EL-BADAWY et al., 2020).

K. pneumoniae is a Gram-negative species included among Enterobacteriales capable of causing different types of nosocomial and also community infection, including BSI, urinary tract infection, pneumonia, liver abscess, and respiratory, especially in immunocompromised patients (CHEN et al., 2021; LIAO; LIU; ZHANG, 2020; TAN et al., 2019).

K. pneumoniae is considered the second leading cause of BSI due to Gram negative bacillus (GNB), less frequent than *E. coli* (MARTIN; BACHMAN, 2018). *K. pneumoniae* extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) bacteremia leads to a worse prognosis, including more frequent admissions to Intensive Care Units (ICU) and higher mortality after 30 days of hospitalization (DE ANGELIS et al., 2018).

Due to the increase in MDR GNB infections, polymyxin are increasingly used as last resort therapeutic options against these pathogens (BAKTHAVATCHALAM et al., 2018; MOFFATT; HARPER; BOYCE, 2019; ZUSMAN et al., 2017). However, the extensive use of colistin as a livestock feed additive, along with its inappropriate use in clinical medicine, has led to

reservoirs of high levels of resistance in GNB such as *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli* and *P. aeruginosa* (SILVA et al., 2022; TAN et al., 2019).

Evidence is accumulating on the role of the *mgrB* gene, which is the most frequently reported mechanism of polymyxin resistance in *K. pneumonia* (KpnCRPR) (SRINIVAS; RIVARD, 2017). Sequence type 258 (ST258), an international high-risk epidemic CRKP lineage, is frequent in European and American countries (Wyres et al., 2020), whereas ST 11 is the most common CRKP clone in China and Brazil, and is part of the clonal complex 258 (CC258) and is a single-locus variant of ST258 (LIAO; LIU; ZHANG, 2020).

Considering that BSI are infections with high morbidity and mortality and that the resistance to polymyxins in KPCR isolates has become a public health problem in word wide, the aim of this work was to molecularly characterize the KpnCRPR isolates resistant to BSI polymyxins, recovered from patients hospitalized at the University Hospital of Londrina, from 2015 to 2020.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain selection

This study evaluated 44 KpnCRPR isolates from patients with BSI of in patients at the University Hospital of Londrina, from January 2015 to October 2020. The inclusion criteria were peripheral blood BSI for *K. pneumoniae* from patients with more than 48 h of hospitalization, as described in the CDC criteria (CDC, 2018). The isolated be resistant to CRPR. Exclusion criteria were BSI isolated from catheters and those whose medical records had incomplete information. The isolates were stored in nutrient agar (room temperature) and TSB (Tryptic Soy Broth) glycerin at 15% (-20 °C) until this study was carried out. The study was approved by the Research Ethics Committee of the State University of Londrina CAAE 43013315.8.0000.5231.

Clinical and laboratory data

Demographic and laboratory data were collected from KpnCRPR identified from patients com BSI, including age, gender, comorbidities, previous use of antibiotics, Charlson comorbidity index and other information from physical records provided for consultation by Medical and Statistical Archive Service, and the Labhos Computerized System (Table 1).

Antibiotic susceptibility testing

The samples were identified by VITEK®2 GN ID card and the susceptibility profile with AST 239 (bioMérieux, EUA), as described in Institute of Clinical and Laboratory Standards (CLSI, 2018). The phenotypic testing to screen strains KpnCRPR, included the Colispot and Polispot agar test (VESPERO et al., 2021).

Molecular analysis

The presence of genes encoding carbapenemases was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR) to *bla*KPC (BRADFORD et al., 2004), MBL genes (*bla*IMP; *bla*VIM; *bla*GIM; and *bla*SPM) (ELLINGTON et al., 2006), *bla*NDM (DOYLE et al., 2012) and *mcr-1* gene (ZHOU et al., 2019).

DNA isolation and whole-genome sequencing

For DNA extraction, strains were grown on Mueller–Hinton Agar overnight at 37°C. Subsequently, a single colony was inoculated in 2 mL of Luria–Bertani broth for 12 h at 37°C. The suspension was used for DNA extraction and purification and DNA extraction by kit Invitrogen, Carlsbad, CA. The extracted DNA was quantified by Qubit dsDNA (double-stranded DNA) BR

assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). After quantification, the DNA was used to construct a paired-end library (150 bp), sequenced using the NextSeq platform (Illumina). The instructions of each manufacturer were followed in all steps.

Bioinformatic analysis

Genome quality filter and assemblies were performed by the CLC Genomics Workbench version 7.0 (Aarhus, Denmark). Multilocus sequence type (MLST), resistome and virulome were identified using MLST v2.0 (LARSEN et al., 2012), ResFinder v3.1 (BORTOLAIA et al., 2020), VirulenceFinder v2.0, (KLEINHEINZ; JOENSEN; LARSEN, 2014), PlasmidFinder v2.1 (CARATTOLI et al., 2014), FimTyper v1.0 (ROER et al., 2017) and SerotypeFinder v.2.0 (JOENSEN et al., 2015), respectively. The BacMet database (Pal et al., 2013) was used to identify biocides and heavy metal (HM). The Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) were used to create a single nucleotide polymorphisms (SNPs) project to strains that showed the same STs, which these genomes were aligned against genomes of others Brazilian studies.

Results

During the study period, 44 isolates of KpnCRPR to BSI polymyxins isolated from peripheral blood were analyzed. Patients had a mean age of 57.5 years and 29% were male. The prevalent comorbidity was major burned with 18.2%, followed by heart disease 15.9%, surgery 13.6%, sars-Cov-2 and diabetes type-1 both with 11.4%, chronic lung disease 9.1%, chronic kidney failure 6.8%, malignant tumor 4.5% and chronic hepatitis B, crohn's disease, human immunodeficiency virus systemic lupus systemic erythematosus with 2.3%.

The Charlson comorbidity index showed that 68.1% of patients had > 2 score, 11.4% = 2 and 20.5% had between 0 -1 score. During the hospitalization period, all patients underwent at least 1 type of invasive procedure: central

venous catheter 77.3%, mechanical ventilation 72.7%, indwelling vesical probe 34.1% and hemodialysis 22.7%.

The 44 patients in the study had already used antimicrobials before BSI due to KpnCRPR, increasing the chance of the infection in question, the most commonly administered antimicrobial was polymyxin 72.7% followed by aminoglycosides 52.3%, vancomycin 40.1%, third-generation cephalosporins 36.4%, carbapenems 31.8%, antifungals 29.5%, tigecycline 22.7%, quinolones 18.2%, fourth-generation cephalosporin 13.6%, Piperacillin-Tazobactam 11.4%, Sulfamethoxazole Trimethoprim 9.1%, Phosphomycin 6.8%, Linezolid 6.8%, Daptomycin 4.5% and Oxacillin 2.3%. This study shows that 59% of the patients died (Table 1).

Table 1 Baseline characteristics of patients, infectious processes and antimicrobial treatments.

CHARACTERISTICS (n= 44)			
Age (years), mean (range)	57.5 (9-85)	Invasive Procedures, n (%)	
Male gender, n (%)	29 (65.9)	Central Venous Catheter	34 (77.3)
Charlson Comorbidity index		Mechanical ventilation	32 (72.7)
Mean, range	3.36 (0-9)	Hemodialysis	10 (22.7)
Comorbidity groups (Charlson index), n (%)		Delay Vesical Tube	15 (34.1)
Low (0–1)	9 (20.5)	Previous use of antibiotics, n (%)	
Medium (2)	5 (11.4)	Aminoglycoside	23 (52.3)
High (>2)	30 (68.1)	Antifungals	13 (29.5)
Comorbidities, n (%)		Carbapenems	14 (31.8)
Big burned	8 (18.2)	Ceftazidime Avibactam	10 (22.7)
Chronic hepatitis B	1 (2.3)	Cephalosporin fourth generation	6 (13.6)
Chronic kidney failure	3 (6.8)	Cephalosporin third generation	16 (36.4)
Chronic lung disease	4 (9.1)	Daptomycin	2 (4.5)
Crohn's disease	1 (2.3)	Fosphomycin	3 (6.8)
Diabetes type 1	5 (11.4)	Linezolid	3 (6.8)
Heart disease	7 (15.9)	Oxacillin	1 (2.3)
Human immunodeficiency virus	1 (2.3)	Polymyxins	32 (72.7)
Malignant tumor	2 (4.5)	Piperacillin-Tazobactam	5 (11.4)
Sars-Cov-2	5 (11.4)	Quinolone	8 (18.2)
Surgery	6 (13.6)	Sulfamethoxazole Trimethoprim	4 (9.1)
Systemic lupus erythematosus	1 (2.3)	Tigecycline	10 (22.7)
		Vancomycin	18 (40.1)
		Death	
		Total	26 (59)

Some clones turned out to be genetically identical. Only 2 types of STs were identified, the most prevalent was ST11 (40, 90.9%), followed to a lesser extent by ST 258 (4, 9.1%). The genomic analysis predicted genes associated

with several types of resistance, among them we found β -lactam resistance genes predominating in 100% of the studied strains: *blaKPC-2*, *blaTEM 1D*, *blaSHV-11*, in a smaller proportion we found the genes *blaCTX-M-2* 36.4%, *blaCTX-M-14* 9.1%, *blaCTX-M-15* 31.8% and *blaOXA-1* 31.8%. Resistance genes were also found for: the aminoglycoside (*aac(3)-lia* 65.1%, *aac(6')/lb* 59.1%, *aac(3)-lid* 40.1%, *aac(6')-lb-cr* 31.8%, *sat2* 40.9%, *strA* 40.9%, *strB* 40.9%, *aadA2* 9.1%, *aph3-la* 9.1%, *rmtB* 9.1%); macrolide resistance (*mphA* 9.1%); phenicol resistance (*catA1* 68.2 %, *florR* 9.1%); sulfonamide resistance (*sul1* 68.2%, *sul2* 40.9%); tetracycline resistance (*thetA* 59.1%, *tetD* 31.8%, *tetG* 9.1%); trimethoprim resistance (*dfrA14* 31.8%, *dfrA30* 59.1%); fluoroquinolone resistance (*gyrA/pac* 100%); polymyxin resistance (*mrgB* mutation 100%) and also, porin-mediated antimicrobial resistance (*ompK* mutation 68.2%).

In this study, genomic analysis also detected viruloma genes from Colibactin synthesis *clb* cluster 59.1%, Yersiniabactin synthesis *ybtS* cluster 90.9%, Type 3 fimbriae synthesis *mrk* cluster 100%, Ferric aerobactin receptor *iutA* 68.2%, Mobile integrative conjugative element *ybt-/ICRkp10* 59.1% and *ybt10/ICEkp4* 31.8%. And the virulence genes involved in capsule synthesis *wzy 64* 59.1%, *wzy 75* 31.8%, K-locus 64 59.1%, K-locus105 31.8%, K-locus 107 9.1%, O-locus O2v1 59.1%, O-locus O2v2 31.85%, YbST 346-1LV 40.9%, YbST 26-2LV 9.1%, YbST 26 22.7% and CbST 17 59.1% (Figure 1).

Discussion

Our work evaluated the period pre-pandemic and only one year of the Covid-19 pandemic. However, it has already been possible to observe that BSI infections by KpnCRPR were present in patients with the coronavirus. Studies show that secondary bacterial infections play crucial roles in the mortality and morbidity associated. Nosocomial outbreaks of drug-resistant *K. pneumoniae* during the COVID-19 pandemic revealed a worrying scenario (GASPAR et al., 2022) and stands out as the most frequent pan-drug resistant bacteria (PDR)(SULAYYIM et al., 2022).

A research developed by Gaspar et al. (2021) showed that the rate of *K. pneumoniae* resistance to polymyxin B increased during the Covid-19 pandemic in Brazil, suggesting that the limited therapeutic arsenal may be among the main contributors to mortality in patients with antibiotic resistance. In this context, one of the comorbidities that predominated in our work was Sars-Cov-2 infection, although the selection of our samples took place in a short period of the pandemic, it was still possible to isolate a substantial number of samples from patients infected by Covid-19. According to Tetro (2020), most patients hospitalized with a new severe acute respiratory syndrome virus acquired a secondary bacterial infection.

Our searches of the clinical records showed that 72.7% of the study patients had previously used polymyxin, followed by aminoglycosides 52.3%, vancomycin 40.1%, at least 15 days before being diagnosed with BSI by KpnCRPR, indicating that this is a possible contributing factor for antimicrobial resistance. According to this result, a study by Singulani et al. (2022), describes 79 critically ill hospitalized COVID-19 patients with secondary bacterial or fungal infections, who were previously treated with ceftriaxone (90.7% of patients), vancomycin (86.0%), polymyxin B (74.4 %). Sulayyim et al. (2022) reports that during the COVID-19 pandemic, there were misuses of antibiotics, either in health institutions or in communities, which in turn contributed to the increase in antimicrobial resistance.

This data is in line with the result of The Charlson comorbidity index showed that 68.1% of patients had > 2 score, which is a predictor of high risk of mortality in hospitalized patients. The WHO highlighted antimicrobial resistance

as an invisible factor in the pandemic; increased mortality rates, as a result, could culminate in 10 million deaths per year associated with bacterial infections resistant to various classes of antimicrobials by 2050 (GASPAR et al., 2021). The present study shows that 59.1% of the patients evolved to died.

Only 2 ST were identified, the most prevalent was ST11, followed to a lesser extent by ST 258. This STs are associated with multidrug resistance, including carbapenem resistance strains.(FANGYOU YU, A, B JINGNAN LV, B SIQIANG NIU, C HONG DU, D BARRY N. KREISWIRTH, 2018).

K. pneumoniae with *bla*KPC was first identified in an ST258 isolate in 1996 in the southern United States. Over time, ST258 was detected in geographically diverse regions of the United States, and in 2009 it became evident that ST258 was the predominant clone in the country, accounting for 70% of *K. pneumoniae* isolates with *bla*KPC obtained from different parts of the country (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015). *K. pneumoniae* ST11 producing KPC-2 emerged in China and was first detected in 2012 (GUO et al., 2022). The study by Cantoâ n; Gijoân; Ruiz-Garbajosa, 2020, analyzed genomic sequences of more than 1700 clinical isolates of *K. pneumoniae* retrieved from 244 hospitals in 32 countries in Europe. Of these, nearly 70% of the carbapenemase producing isolates were grouped into four clonal lineages (ST11, ST15, ST101 and ST258/512) demonstrating a high degree of intra- and inter-hospital dissemination of these clones throughout Europe.

In Brazil, a study carried out in 3 hospitals in the State of Mato Grosso do Sul analyzed 99 KPCR isolates that found different types of STs: St 273 (n=13), ST11 (n=11), ST1298 (n =10), ST13 (n=8), ST2687 (n=7), ST 37 (n=6), ST309(n=4), ST304, ST2751 and ST3178 (N = 3), ST17 (n=2) , ST323 and ST779 (n=2) ST70, ST401, ST406, ST1075, ST2084 and ST2260 (n=1) (RODRIGUES et al., 2022).

The genomic analysis predicted in our results genes associated with several types of resistance, among them we found betalactam resistance genes of type *bla*KPC-2, *bla*TEM 1D, *bla*SHV-11, predominating of the strains studied, in a smaller proportion we found the genes *bla*CTX-M- 2 36.4%, *bla*CTX-M-14, *bla*CTX-M-15 and *bla*OXA-1. The study by Moraes et al. 2022 carried out in the same hospital as the present study, analyzed isolates of *K. pneumoniae* from BSI and showed that 90.7% (49/54) carried the *bla*KPC-2 gene. In the research

by Effah et al. 2020, the authors found in *K. pneumoniae* mediator genes that confer resistance to beta-lactam antimicrobials, of CTX-M-1 (41,9%), SHV-11 (41,8%), TEM (39,5%), CTX-M-15 (35,3%), KPC-2 (14,6%), but unlike our work, they also found the gene NDM-1 (6,7%).

The successful worldwide spread of *K. pneumoniae* strains producing KPC-2 belonging to CC258, which includes the ST11 and ST258 sequence type, is often responsible for outbreaks of nosocomial infections (MANCINI et al., 2018). Also, Huang et al, 2022 and 2023, has described an emergency of fatal ST11-KL64 tigecycline resistant hypervirulent *K. pneumoniae* clone carrying *bla*NDM and *bla*KPC in plasmids, in China. In our study more than half (40, 90.9%) of the KpnCRPR isolates belong to ST11.

In *K. pneumoniae*, it is well established that the most frequent mechanism of polymyxin resistance is the inactivation of the chromosomally encoded *mrgB* gene (ROCH et al., 2022). A work from Brazil coincides with our finding, the author Boszczowski et al., 2019 found the presence of the mutated *mrgB* gene in 27 of 28 BSI KpnCRPR isolates from patients in a tertiary hospital.

The *mrgB* mutation gene that confers resistance to polymyxins was found in all BSI KpnCRPR isolates. Previously, through the screening of the phenotypic colispot and polispot test, resistance to polymyxins was detected, which was confirmed with the genotypic analysis.

Numerous virulence factors encoded by accessory genes are known to further increase the severity of infections caused by *K. pneumoniae* (WYRES; LAM; HOLT, 2020). *K. pneumoniae* uses a variety of virulence factors to colonize and propagate in a host cell. These include at least (a) surface antigen, particularly capsular polysaccharide (CPS, K antigen); (b) siderophores responsible for *iron* binding: enterobactin siderophore (central siderophore; coded by *ent*), yersiniabactin, aerobactin and salmochelin (accessory or acquired siderophores: coded by *ybt*, *iuc* and *iro*, respectively) and (c) adhesion variables responsible for binding to host cell surfaces, such as type 1, type 3 *fimbriae*, and non-*fimbrial* adhesion proteins (DONG et al., 2018; WYRES; LAM; HOLT, 2020).

A study carried out in Kenya of 24 environmental and clinical hospital isolates of *K. pneumoniae*, identified the Yersiniabactin synthesis locus of 4 distinct types of *ybt*: *ybt14*, *ybt15*, *ybt 16* and *ybt9* (MURAYA et al., 2022).

This study from Brazil, carried out in newborns with urinary tract infection by *K. pneumoniae*, detected 3 (30%) genes for colibactin (*clb A* and *clb B*) and aerobactin (*iro D* and *iro N*) (KHAERTYNOV et al., 2018).

Hypermucoviscous phenotype and genes related to mucus viscosity, genes for lipopolysaccharide biosynthesis, iron absorption and transport genes are all virulent factors employed by *K. pneumoniae* strains in pathogenesis. Iron is an important component for the survival of *K. pneumoniae*, as free iron is scarce in the host plasma, *K. pneumoniae* acquires iron predominantly through the secretion of siderophores. Among the siderophores secreted by *K. pneumoniae*, aerobactin is considered the most important virulence factor, as it can cause severe infection by aiding the transport of the organism from the intestinal tract to various tissues and also the multiplication in tissues (EFFAH et al., 2020; RUSSO; MARR, 2019).

The researchers Yang et al. 2021 analyzed 425 isolates of *K. pneumoniae* from BSI from patients from nine tertiary hospitals in Guangdong province, China, between 2005 and 2019. Detected virulence genes (hypermucoid) type (CRKP=4; carbapenem-sensitive *K. pneumoniae* ((CSKP)=14), *rmpA2* (hypermucoid) (CRKP=0; CSKP=1), *iucaABCD/iutA* (aerobactin) (CRKP=4; CSKP=15), and *iroBCDN* (salmochelins) (CRKP=1; CSKP=14).

The genotoxic polyketide colibactin, which induces DNA damage in eukaryotic cells, was first described in *E. coli*, but is also found in ~10% of *K. pneumoniae*, encoded in ICEKp10 per *clb*. Colibactin is proposed to promote colonization of the intestine, spread to the blood and other organs, and may contribute to colorectal cancer. In *K. pneumoniae*, colibactin is mainly associated with liver abscess clones and, but is also present in subpopulations of hypervirulent clones (WYRES; LAM; HOLT, 2020).

CONCLUSION

Our study characterized genes encoding resistance and virulence of *K. pneumoniae* responsible for serious infections.

These predictors will be useful for decision-making about complications caused by *K. pneumoniae* in clinical practice, to insert measures that control and/or prevent dissemination, until new drugs, alternatives and therapeutic approaches are available.

REFERENCE

- BAKTHAVATCHALAM, Y. D. et al. Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An update. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 12, p. 124–136, 2018.
- BORTOLAIA, V. et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 12, p. 3491–3500, 2020.
- 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, 1 jul. 2004.
- CARATTOLI, A. et al. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3895–3903, 2014.
- CHEN, J. et al. Shift in the Dominant Sequence Type of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infection from ST11 to ST15 at a Medical Center in Northeast China, 2015–2020. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 14, p. 1855–1863, maio 2021.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100. Wayne PA. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100. Wayne PA**, p. 282, 2018.
- CONTE, V. et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from invasive infections in Italy: Increasing diversity with predominance of the ST512 clade II sublineage. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 12, p. 3386–3391, 2016.
- DONG, N. et al. Genome analysis of clinical multilocus sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* from China. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 2, 1 fev. 2018.
- DOYLE, D. et al. Laboratory Detection of Enterobacteriaceae That Produce Carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877–3880, dez. 2012.

EFFAH, C. Y. et al. Klebsiella pneumoniae: an increasing threat to public health. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 19, n. 1, p. 1, 9 dez. 2020.

EL-BADAWY, M. F. et al. The first Egyptian report showing the co-existence of blaNDM-25, blaOXA-23, blaOXA-181, and blaGES-1 among carbapenem-resistant k. Pneumoniae clinical isolates genotyped by BOX-PCR. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1237–1250, 2020.

ELLINGTON, M. J. et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-B-lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 321–322, 13 nov. 2006.

FANGYOU YU, A, B JINGNAN LV, B SIQIANG NIU, C HONG DU, D BARRY N. KREISWIRTH, J L. C. crossm Multiplex PCR Analysis for Rapid Detection of Klebsiella. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1–7, 2018.

GASPAR, G. G. et al. Pre-and post-covid-19 evaluation of antimicrobial susceptibility for healthcare-associated infections in the intensive care unit of a tertiary hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, p. 1–4, 2021.

GONG, X. et al. Molecular characterization and epidemiology of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae isolated from the Eastern region of Heilongjiang Province, China. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.

GUO, L. et al. Genomic Analysis of KPC-2-Producing Klebsiella pneumoniae ST11 Isolates at the Respiratory Department of a Tertiary Care Hospital in Beijing, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. June, p. 1–10, 2022.

JOENSEN, K. G. et al. Rapid and easy in silico serotyping of Escherichia coli isolates by use of whole-genome sequencing data. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 2410–2426, 2015.

KLEINHEINZ, K. A.; JOENSEN, K. G.; LARSEN, M. V. Applying the ResFinder and VirulenceFinder. **Bacteriophage**, v. 4, n. December, p. 1–7, 2014.

LARSEN, M. V. et al. Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1355–1361, abr. 2012.

LIAO, W.; LIU, Y.; ZHANG, W. **Virulence evolution, molecular mechanisms of resistance and prevalence of ST11 carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in China: A review over the last 10 years.** [s.l.] Taibah University, 2020. v. 23

MANCINI, S. et al. Klebsiella pneumoniae co-producing KPC and RmtG, finally targeting Switzerland. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 90, n. 2, p. 151–152, 2018.

MĘDRZYCKA-DABROWSKA, W. et al. Carbapenem-resistant klebsiella pneumoniae infections in icu covid-19 patients—a scoping review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 10, p. 1–13, 2021.

MOFFATT, J. H.; HARPER, M.; BOYCE, J. D. Mechanisms of Polymyxin

Resistance. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.: s.n.]. v. 1145p. 55–71.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J.-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. NOV, p. 1–19, 26 nov. 2014.

PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5873–5884, 2015.

ROCH, M. et al. Characterization of Amino Acid Substitution W20S in MgrB Involved in Polymyxin Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 1, p. 1–5, 2022.

RODRIGUES, A. C. S. et al. Molecular Epidemiology of bla KPC-Encoding *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Public Hospitals in Midwest of Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 28, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 2022.

ROER, L. et al. Development of a Web Tool for *Escherichia coli* Subtyping Based on fimH Alleles. v. 55, n. 8, p. 2538–2543, 2017.

RUSSO, T. A.; MARR, C. M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 3, p. 1–42, 19 jun. 2019.

SILVA, K. E. DA et al. Overview of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, p. 1–5, 2022.

SRINIVAS, P.; RIVARD, K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. **Current Infectious Disease Reports**, v. 19, n. 11, p. 38, 11 nov. 2017.

SULAYYIM, H. J. AL et al. Antibiotic Resistance during COVID-19: A Systematic Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 19, 2022.

TAN, D. et al. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates and their interactions with lytic phages. **Viruses**, v. 11, n. 11, p. 1–18, 2019.

VESPERO, E. C. et al. Performance of Laboratory Methods for Detection of Polymyxin-Resistance in Gram-Negative Bacillus. **Journal of Clinical & Experimental Pathology**, v. 11, 2021.

WYRES, K. L.; LAM, M. M. C.; HOLT, K. E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 344–359, 13 jun. 2020.

YANG, Y. et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant and virulent plasmids in *Klebsiella pneumoniae* from patients with bloodstream infections in China. **Emerging Microbes and Infections**, v. 10, n. 1, p. 700–709, 2021.

YUNGYUEN, T. et al. Nationwide Surveillance and Molecular Characterization of Critically Drug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Results of the Research University Network Thailand Study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 9, p. 1–12, 17 ago. 2021.

ZHOU, Y. et al. Discovery of a potential MCR-1 inhibitor that reverses polymyxin activity against clinical mcr-1-positive Enterobacteriaceae. **Journal**

of *Infection*, v. 78, n. 5, p. 364–372, maio 2019.

ZUSMAN, O. et al. Polymyxin monotherapy or in combination against carbapenem-resistant bacteria: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 72, n. 1, p. 29–39, 2017.

NEW DELHI METALLO-BETA-LACTAMASE (NDM) *PROVIDENCIA STUARTII* ISOLATED DURING THE COVID-19 PANDEMIC IN A HOSPITAL IN SOUTHERN BRAZIL

Introduction: Different enterobacteria harboring New Delhi metallo-beta-lactamase type 1 (NDM-1) have been reported worldwide. Among them is *P. stuartii*, which is an emerging pathogen in nosocomial infections.

Objective: In the present study, clinical isolates of *P. stuartii* harboring NDM-1, were characterized during the Covid-19 pandemic, from patients at the HU (University Hospital) in the city of Londrina.

Materials and methods: From 04/2021 to 09/2021, a total of 50 *P. stuartii* isolates were identified through the Vitek2® automation system. Genetic variability was performed by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus by the PCR technique (ERIC-PCR) and the isolates were sequenced using the NextSeq (Illumina) to determine their sequence type (ST), their resistance gene content (resistome) and their composition of virulence genes and plasmids. The statistical analysis was realized in SPSS version 2.0.

Results: From 50 *P. stuartii* isolates researched, 21 showed NDM-1 type metallo-beta-lactamase production. Of these, 12 (57.2%) were tracheal aspirates, 5 (23.8%) blood, 2 (9.5%) urine and 2 (9.5%) skin and soft tissue. When demographic data was evaluated, there were associations with Sars-cov2 infected patients ($p=0.013$), use of invasive procedures central venous catheter ($p= 0.012$), mechanical ventilation ($p= 0.006$), hemodialysis ($p= 0.033$), indwelling probe ($p= <001$) and previous use of aminoglycosides ($p= 0.025$), polymyxins ($p= 0.038$), and tigecycline ($p= 0.033$), vancomycin ($p= 0.045$) and the outcome of death ($p= 0.021$). The 21 clinical isolates of *P. stuartii bla*NDM-1 were analyzed by the genomic sequencing technique and showed resistance genes to β -Lactams *bla*OXA-1 and resistance genes to other classes of antimicrobials.

Conclusion: These data was the first description of NDM-1 carbapenemase presence among *P.stuartii* isolates, which were identified from patients at the HU of Londrina, with little genetic variability.

Key words: *Providencia stuartii*; Carbapenemase; New Delhi metallo-beta-lactamase; Vitek2®, Sars-cov-2.

INTRODUCTION

The exponential growth in antibiotics use during COVID-19 is possibly inducing further pressure, which contributes to the selection of antibiotic-resistant bacteria, including carbapenemase producers (AYOUB MOUBARECK; HAMMOUDI HALAT, 2022). Among these bacteria, there are *Providencia* species Gram Negative Bacillus who belonged to the Enterobacterales order and Morganellaceae family. The genus *Providencia* includes five species: *P. stuartii*, *Providencia rettgeri*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia heimbachae*, and *Providencia rustigianii* (LIU; WANG; FANG, 2020), whose first two are the common causes of hospital-acquired infections (IWATA et al., 2020). The involvement of these opportunistic pathogens in human health-care associated infections was recognized a long ago and several health care outbreaks of *Providencia* spp. have been described (RAKOV et al., 2021; ZAVASCKI et al., 2012).

Reports from various countries established the emergence of multiple drug resistant (MDR) isolates of *Providencia* species and demonstrated their ability to disseminate amongst patients in hospital settings, leading to nosocomial outbreaks emerged in treatment challenges and complications (ABDALLAH et al., 2018; RUS et al., 2020; ZAVASCKI et al., 2012). *P. stuartii* infections are often difficult to control and have substantial impacts on patient morbidity, mortality, treatment and management costs (MOLNÁR et al., 2019). *P. stuartii* is intrinsically resistant to colistin and tigecycline, however carbapenem-resistant *P. stuartii* (CRPS) are increasingly reported, mainly due to *bla*NDM-1 (HOARD et al., 2020).

By April 2021, the only carbapenemase detected in *P. stuartii* in the HU was the KPC type from there on, this scenario changed with the emergence of *P. stuartii* carrying *bla*NDM-1. Therefore, this study aimed to characterize a new

outbreak of *P.stuartii* harboring the *bla*NDM gene among isolates from April to September, 2021.

MATERIALS AND METHODS

During the period of 04/2021 to 09/2021, a total of 50 strains of *P. stuartii* were studied. For molecular analysis, the 21 isolates that carried NDM-1 metallo-beta-lactamase were selected and isolated from tracheal aspirates, blood, urine, skin and soft tissues. Samples were identified with VITEK®2 GN ID cards and susceptibility profiling with AST 238 and 239 (bioMérieux, USA), as described in the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2021). The samples that showed resistance to carbapenems underwent phenotypic and genotypic characterization. One isolate per patient was included in the study.

PHENOTYPIC TESTING

The isolates were screened for carbapenemase production by Modified Carbapenem Inactivation Method (mCim) and EDTA - Carbapenem Inactivation Method (eCim), as described CLSI 2021.

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; SPM and NDM) (DOYLE et al., 2012; ELLINGTON et al., 2006) 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, posteriorly, the fingerprints were

analyzed using BioNumerics software (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, version 4.6), with a 2% tolerance position. 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. Strains were considered genetically related if the similarity index was $\geq 85\%$.

DNA ISOLATION AND WHOLE-GENOME SEQUENCING

For DNA extraction, strains were grown on Mueller–Hinton Agar overnight at 37°C. Subsequently, a single colony was inoculated in 2 mL of Luria–Bertani broth for 12 h at 37°C. The suspension was used to continue extraction and purification by the DNA extraction kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). The extracted DNA was quantified by Qubit dsDNA (double-stranded DNA) BR assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Once quantified, the DNA was used to construct a paired-end library (150 bp), being sequenced through the NextSeq platform (Illumina). The instructions of each manufacturer were followed in all the steps.

BIOINFORMATIC ANALYSIS

Genome quality filters and assemblies were performed by the CLC Genomics Workbench version 7.0 (Aarhus, Denmark). Multilocus sequence type (MLST), resistome and virulome were identified using MLST v2.0 (LARSEN et al., 2012), Res Finder v3.1 (BORTOLAIA et al., 2020), Virulence Finder v2.0, (KLEINHEINZ; JOENSEN; LARSEN, 2014), Plasmid Finder v2.1 (CARATTOLI et al., 2014), FimTyper v1.0 (ROER et al., 2017) and Serotype Finder v.2.0 (JOENSEN et al., 2015), respectively. The BacMet database (Pal et al., 2013) was used to identify biocides and heavy metal (HM). The Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) was used to create a single nucleotide polymorphisms (SNPs) project to strains that showed the same STs, and these genomes were aligned against genomes of others Brazilian studies.

CLINICAL AND LABORATORY DATA

Demographic and laboratory data was collected from patients with *P. stuartii*, 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 Labhos Computerized System. The study was approved by the Research Ethics Committee of the State University of Londrina CAAE43013315.8.0000.5231.

STATISTICAL ANALYSIS

Data was 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

From 04/2021 to 09/2021, a total of 50 isolates of *P. stuartii* were identified, having 21 isolates producing carbapenemases with the presence of blaNDM-1. The number of cases distribution in relation to the months in which these isolates were identified are shown in Graph 1. These isolates were obtained from, 12 (57.2%) were tracheal aspirates, 5 (23.8%) blood, 2 (9.5%) urine and 2 (9.5%) skin and soft tissue. The sensitivity test showed resistance to almost all antimicrobials, maintaining sensitivity only to aztreonam (100%). The mCim - Modified Carbapenem Inactivation Method and eCim - EDTA - Carbapenem Inactivation Method phenotypic tests indicated metallo-type carbapenemase in all test isolates. The 21 isolates were also analyzed by the genomic sequencing technique and showed resistance genes to betalactams NDM-1, OXA-1 and resistance genes to other classes of antimicrobials such as aminoglycosides (*aph(3')*-VI, *aac(2')*la, *aac(6')*-Ib-cr, *aadA1*), fluoroquinolones (*qnrD1*), cloranfenicol (*catA3*, *catB3*), pathway antagonists of folate (*sul1*, *dfrA1*, *sul2*), rifampicin (*arr3*), macrolide (*msr(E)*, *mph(A)*, *mph(E)*) and tetracyclines

(*tet(A)* e *tet(B)*). The test also detected virulence genes for *hcp1*, *hcp*, *aec16*, *cheY*, *fliQ*, *tufA*, *kdsA*, *gndA*, *rcsB*, *clpV*, *fur*, *hcp2/tssD2*, *flhC* and *ysaS* (Figure 1). The ERIC-PCR results showed that isolates had more than 87% genetic similarity.

When the demographic data was evaluated, the average age of the 21 patients with *P. stuartii* NDM was 56 years, 71% were male, and had an average hospital stay of 43 days. The statistical test comparing the *P. stuartii* NDM strains with non-NDM *P. stuartii* established an association for patients: with a positive result for Sars-cov-2 ($p = 0.013$), using of invasive procedures central venous catheter ($p = 0.012$), mechanical ventilation ($p = 0.006$), hemodialysis ($p = 0.033$), indwelling probe ($p = <0.001$), in previous use of aminoglycosides ($p = 0.025$), polymyxins ($p = 0.038$), tigecycline ($p = 0.033$), vancomycin ($p = 0.045$) and death outcome ($p = 0.021$) (Table1).

Graph 1. Distribution of the number of *P. stuartii* NDM cases in relation to the months of isolation.

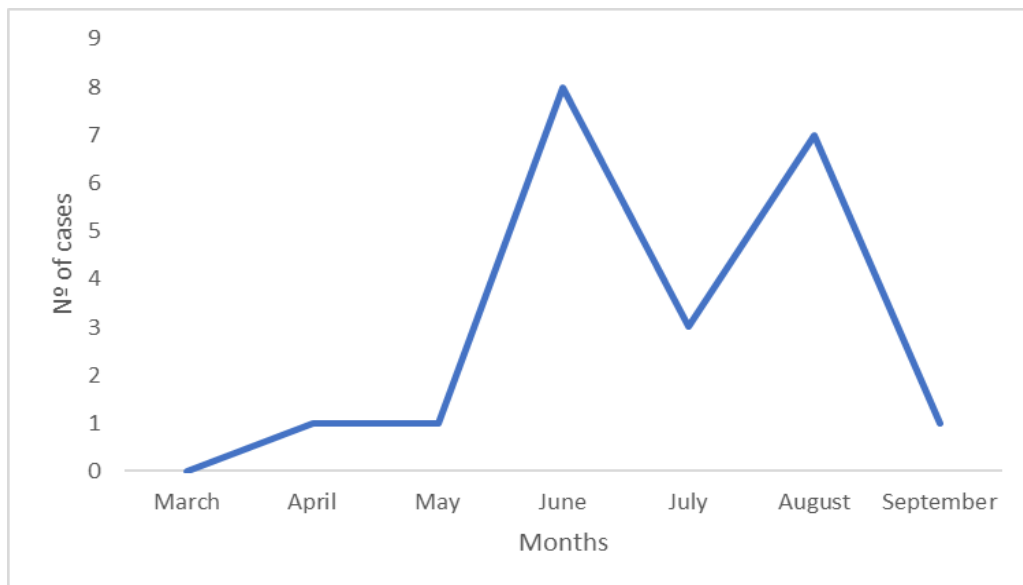


Table1: Comparison of clinical parameters between two groups of patients with *P. stuartii*.

	Total N= 50	<i>P. stuartii</i> NO NDM N= 29	<i>P. stuartii</i> NDM N= 21	<i>p</i> value	Odds Ratio (IC 95%)
Age (years), mean (range)	53 (22-88)	51,8 (22-88)	58 (22-73)		
Male gender, n (%)	33 (66)	18 (62)	15 (71)	0,557	
Hospitalization days, mean (range)	48 (3-185)	50 (4-185)	43 (3-98)		
Comorbidities, n (%)					
Sars-Cov-2	36 (72)	17 (59)	19 (90,5)	0,013	6,706 (1,309) (34,353)
Diabetes Mellitus (DM)	4 (8)	2 (7)	2 (10)	0,735	
Renal insufficiency (IR)	3 (6)	2 (7)	1 (5)	0,754	
Liverfailure (IH)	2 (4)	*	2 (10)	*	
Chronic obstructive pulmonary disease (DPOC)	8 (16)	3 (10)	5 (24)	0,2	
Stroke (AVC)	6 (12)	2 (7)	4 (19)	0,192	
Ulcer	1 (2)	*	1 (5)	*	
Comorbidity groups (Charlson index), n (%)					
Low (0-1)	24 (48)	19 (66)	5 (23,8)		
Medium (2)	6 (12)	2 (7)	4 (19,0)		
High (>2)	20 (40)	8 (28)	12 (57,2)		
Invasive procedures, n (%)					
Central venous catheter (CVC)	33 (66)	15 (52)	18 (86)	0,012	5,6 (1,350) (23,233)
Mechanicalventilation (VM)	32 (64)	14 (48)	18 (86)	0,006	6,429 (1,550) (26,671)
Hemodialysis (HD)	17 (34)	6 (21)	11 (52)	0,033	4,217 (1,219) (14,589)
Urinary delayed catheter (SVD)	18 (36)	3 (10)	15 (71)	<001	21,887 (4,717) (99,527)
Surgery	1 (2)	1 (3)	*	*	
Previous use of antibiotics, n (%)					
Aminoglycoside	26 (52)	11 (38)	15 (71)	0,025	4,091 (1,222) (13,690)
Carbapenems	27 (54)	13 (45)	14 (67)	0,158	
Cephalosporin third generation	5 (10)	2 (7)	3 (14)	0,39	
Cephalosporin fourth generation	4 (8)	1 (3)	3 (14)	0,163	
Ceftazidime Avibactam	12 (24)	7 (24)	5 (24)	1	
Fhosphomycin	5 (10)	2 (7)	3 (14)	0,39	
Quinolone	10 (20)	4 (14)	6 (29)	0,197	
Piperacillin-Tazobactam	3 (6)	1 (3)	2 (10)	0,372	
Polymixins	41(82)	21 (72)	20 (95,2)	0,038	7,619 (0,872) (66,541)
Sulfamethoxazole Trimethoprim	3 (6)	2 (7)	1 (4,8)	0,754	
Tigecycline	17(34)	6 (21)	11 (52,4)	0,033	4,217 (1,219) (14,589)
Vancomycin	20 (40)	8 (28)	12 (57)	0,045	3,5 (1,067) (11,476)
Treatment					
Aminoglycoside	27 (54)	15 (52)	12 (57)	0,144	
Carbapenems	5 (10)	5 (17)	*	*	
Cephalosporin third generation	5 (10)	5 (17)	*	*	
Ceftazidime Avibactam	1 (2)	*	1 (6)	*	
Ceftazidime Avibactam + Aztreonam	2 (4)	*	2 (10)	*	
Quinolone	8 (16)	8 (28)	*	*	
Sulfamethoxazole Trimethoprim	2 (4)	2 (7)	*	*	
Not treat	7 (14)	*	7 (33)	*	
Outcome, n (%)					
Death	31 (62)	17(59)	14 (67)	0,021	4,266 (1,285) (14,155)

p value: <0,05. * : no data

DISCUSSION

Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CRE) infections are associated with a high mortality rate. Regarding the prognostic impact of co-infections, a recent meta-analysis showed that patients with COVID-19 who present co-infections are more likely to die than patients without co-infection, and it's noteworthy that CRE infection was the main cause of mortality (HOARD et al., 2020).

COVID-19 is a potentially serious infection caused by the novel coronavirus, being manifested as severe acute respiratory syndrome. In addition to other related pathologies, this virus is also associated with other infections of hospitalized patients (BEECHING; FLETCHER; FOWLER, 2020; ZHU et al., 2020).

One of the most relevant findings in this study was the comparison between *P. stuartii* NDM strains and non-NDM *P. stuartii* using statistical tests, wherein an association could be detected for patients with a positive result for Sars-cov-2 ($p = 0.013$). According to Bengoechea, Bamford (2020) patients vulnerable to viral lung infections such as influenza, acute respiratory syndrome (SARS) have the highest risk of being co-infected with super bugs. The statistical significance was also highlighted with the use of invasive procedures as central venous catheter ($p = 0.012$), mechanical ventilation ($p = 0.006$), indwelling urinary catheter (SVD) ($p = <001$). Similarly, to the study by Tang et al. (2021), it was found that the use of central venous catheter, mechanical ventilation and urinary catheter ($p < 0.01$) are risk factors for microbial infections in critically ill patients.

The presence of multiple comorbidities is common among patients on hemodialysis and represent an important risk factor for infection (SCHWANKE et al., 2018). Another data from this study, and not less important, showed that hemodialysis was also an invasive procedure that demonstrates statistical significance ($p = 0.033$). The study by Kumar et al. (2021) is in line with our finding, comparing patients with COVID-19, with other infections, without other infections and those who underwent hemodialysis procedures, and obtaining statistically significant results ($p < 0.001$).

Currently, carbapenems, polymyxins, and tigecycline are drugs reserved for treating multidrug-resistant infections. However, continued use of such antimicrobials has increased the rate of resistance to these last resort drugs (OSEI SEKYERE; RETA; BERNARD FOURIE, 2021). Patients in our study had previously used antibiotics with several antimicrobials, but only in previous use of aminoglycosides ($p = 0.025$), polymyxins ($p = 0.038$), tigecycline ($p= 0.033$) and vancomycin ($p= 0.045$), which comparison verified statistical significance (Table1). In the study of Alqahtani et al. (2021), it was observed that patients on antimicrobial therapy at the time of admission were more likely to be positive for carbapenemases genes than those who weren't on antimicrobials. Carbapenem therapy ($p= 0.002$) and colistin ($p= <0.001$) were identified as risk factors for colonization with carbapenem resistance genes.

The predominant biological material with NDM-producing *P. stuartii* was tracheal aspirate with 12 (57.1%) (Figure 1). This data is in agreement with the study of CHONG et al., 2021 which shows that bacterial secondary lung infections were predominantly observed in hospitalized patients with COVID-19.

Among the 21 NDM-producing *P. stuartii* patients, 12 (57.1%) were treated with aminoglycosides and 2 (10%) were treated with a combination of aztreonam and ceftazidime+avibactam. The treatment of these infections is challenging, mainly as a consequence of the bacteria intrinsic resistance to several antibiotics, and, in addition, due to the fact that strains of *Providencia* become increasingly producers of carbapenemase, including the NDM type (SHEN et al., 2022). Recent reports suggest that the combination of aztreonam with ceftazidime-avibactam can be effective against MBL production, decreasing patient mortality compared to other active antibiotics (MCGANN et al., 2021; TIMSIT et al., 2022).

Another important data from our study was the death outcome ($p= 0.021$) which had a relevant result (Table 1). Bardi et al. (2021) analyzed nosocomial infections acquired in the ICU in critical patients with COVID-19, during the main outbreak of the disease in Spain in early 2020, and recorded a high incidence of nosocomial infections, which had a significant impact on mortality, representing the main cause of death in 33% of patients.

The 21 isolates selected for the study had their DNA sequenced. In addition to the *bla*OXA-1 resistance gene, the presence of *bla*NDM-1 was also

detected. The research of Alqahtani et al. (2021) that analyzed 529 rectal smears 138 (26.1%) found positivity rates in hospitals ranging from 8.0% to 67.3%. Among the 138 positive samples, *bla*OXA-48 was detected in 82 (59.4%), *bla*NDM in 19 (13.8%) and *bla*NDM and *bla*OXA-48 together in 12(8.7%).

The first report of NDM-1 occurred in 2008 in India from an isolate of *K. pneumoniae* (Yong et al., 2009). After that, studies indicated the spread of NDM-1 and its variants in different regions of the world, being found on all continents (ESCOBAR PÉREZ et al., 2013; GOTTIG et al., 2013; NORDMANN et al., 2011; ZOU et al., 2015). In Brazil, the first case of NDM-1 was noted in *Providencia rettgeri* and in *Enterobacter cloacae*, reported in the city of Porto Alegre, in 2013 (CARVALHO-ASSEF et al., 2014). Currently, studies show the NDM-1 spread between Enterobacterales species such as *E. cloacae*, *Morganella morganii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, and among non-fermenters such as *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii* (AIRES et al., 2017; PILLONETTO et al., 2014; ROZALES et al., 2014). In 2014, at the HU, a clonal outbreak of 30 *P. stuartii* isolates producing *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) was identified (TAKASHINA et al., 2016). Most recently, during the COVID-19 pandemic, there has been another significant increase in *P. stuartii* isolates, leading to carbapenem resistance (PsCR). In addition to *Blac* genes, we also detected resistance genes to other antimicrobial classes, such as the aminoglycoside (*aph*(3')-VI, *aac*(2')Ia, *aac*(6')-Ib-cr, *aadA1*), fluoroquinolones (*qnrD1*), chloramphenicol (*catA3*, *catB3*), folate pathway antagonists (*sul1*, *dfrA1*, *sul2*), rifampicina (*rr3*), to macrolides (*msr*(E), *mph*(A), *mph*(E)), and (*tet*(A) and *tet*(B)) tetracyclines. The study by Hoard et al. (2020) partly resembles the data from the study in question, where the presence of 13 different resistance genes in *P. stuartii* isolates was observed. Among them, he found genes encoding *Blac* (*bla*OXA-1, *bla*TEM-1, *bla*NDM-1), aminoglycoside-modifying enzymes (*aphA6*, *aac*(3)-IId, *aac*(2')-Ia e *aac*(6')-Ib-cr5), sulfonamide resistant dihydropteroate synthase (*sul1*), chloramphenicol acetyltransferase (*catB3*, *catA3*), rifampin ADP-ribosyl transferase (*arr3*), bleomycin resistance protein (*ble*) and tetracycline resistance protein (*tet*(B)). Lezameta et al. (2020), in a research also similar to the present study, identified fourteen *P. stuartii* antibiotic

resistance genes, including aminoglycoside (*rmtG*, *aac(6')-Ib-cr* e *aac(2')-Ia*), sulfonamides (*sul1* and *sul2*), fluoroquinolones (*qnrVC1*), trimethoprim (*dfrA6*), beta-lactams (the gene *bla*NDM, *bla*OXA-1 and *bla*TEM-135), tetracyclines (*tetB*), phenicols (*catA2*, *catA3* and *catB3*) and rifampin (*arr-3*) resistance genes.

Important virulence genes were detected in this study, such as: *hcp1*, which confers actin rearrangement, apoptosis and release of cytokines as secreted effectors in the extracellular medium (SUGUMAR et al., 2014); *hcp*, a hemolysin co-regulatory protein, Secretion System Type VI, (PENG et al., 2016); *aec16*, no resistance mechanism (VILLODRES et al., 2022); *cheY*, a protein that causes modification in the flagellum rotation, changing the direction of locomotion (HAMER et al., 2010); *fliQ*, membrane protein that is part of the export apparatus in bacteria that flagellate (BAI et al., 2014); *tufa*, elongation factor (WERBROUCK et al., 2007); *kdsA*, gene encoding enzyme p composed of LPS (MEDEIROS FILHO et al., 2021); *rscB*, gene involved in the regulation of phosphorylation (SU et al., 2018); *clpV*, that participates in ATPase/ATPase in sheath recycling (FÖRSTER et al., 2014); *furiron*, absorption regulatory protein (GUO et al., 2017); *hcp2/tssD2*, involved in suppressing the growth of competitors, assists in competition with other microorganisms (HAAPALAINEN et al., 2012); *flhC*, which contributes to the hetero multimeric complex and functions as a transcriptional activator of class 2 flagellum promoters (WANG et al., 2006); and the *ysaSa*, subunit of the secretory system's export apparatus SctS (THOMSON et al., 2006) (Figure 1). As in our research, Lezameta et al. (2020) evaluated *P. stuartii* strains and identified the *cheY* (chemotaxis regulatory protein), *flhC* (flagellar biosynthesis transcriptional activator), *hcp-2* (substrate of the type VI secretion system), as well as the genes *kdsA* (2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase) and *gmhA* (phosphor heptose isomerase, formerly called *lpcA*) that were not found in our study.

In contrast, no virulence gene detected in our study was found in the study by Yuan et al. (2020), however, the author highlights in the summary that the differential distribution of clusters of genes related to virulence can explain the differences in the pathogenicity of *Providencia* isolates.

CONCLUSION

This work characterized NDM-1 metallo-beta-lactamase isolates, among *P. stuartii* isolates identified in patients at the HU, during the COVID-19 pandemic period. The establishment of this new resistance mechanism among *P. stuartii* isolates limits the therapeutic options for these infections in our hospital.

REFERENCE

ABDALLAH, M. et al. First report of carbapenem-resistant *Providencia stuartii* in Saudi Arabia. **New Microbes and New Infections**, v. 26, p. 107–109, 2018.

ALQAHTANI, M. et al. Molecular detection of carbapenem resistance genes in rectal swabs from patients in Gulf Cooperation Council hospitals. **Journal of Hospital Infection**, v. 112, p. 96–103, 2021.

AYOUB MOUBARECK, C.; HAMMOUDI HALAT, D. The Collateral Effects of COVID-19 Pandemic on the Status of Carbapenemase-Producing Pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. March, p. 1–11, 2022.

BAI, F. et al. Assembly dynamics and the roles of Flil ATPase of the bacterial flagellar export apparatus. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 6528, 17 dez. 2014.

BORTOLAIA, V. et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 12, p. 3491–3500, 2020.

BRADFORD, P. A. et al. Emergence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella* Species Possessing the Class A Carbapenem-Hydrolyzing KPC-2 and Inhibitor-Resistant TEM-30 -Lactamases in New York City. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 1, p. 55–60, 1 jul. 2004.

CARATTOLI, A. et al. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3895–3903, 2014.

DOYLE, D. et al. Laboratory Detection of Enterobacteriaceae That Produce Carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877–3880, dez. 2012.

ELLINGTON, M. J. et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-B-lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 321–322, 13 nov. 2006.

FÖRSTER, A. et al. Coevolution of the ATPase ClpV, the Sheath Proteins TssB and TssC, and the Accessory Protein TagJ/HsiE1 Distinguishes Type VI Secretion Classes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 47, p. 33032–33043, nov. 2014.

GUO, Y. et al. The Role of the Regulator Fur in Gene Regulation and Virulence of *Riemerella anatipestifer* Assessed Using an Unmarked Gene Deletion System. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. AUG, p. 1–16, 25 ago. 2017.

HAAPALAINEN, M. et al. Hcp2, a Secreted Protein of the Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000, Is Required for Fitness for Competition against Bacteria and Yeasts. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 18, p. 4810–4822, 15 set. 2012.

HAMER, R. et al. Deciphering chemotaxis pathways using cross species comparisons. **BMC Systems Biology**, v. 4, n. 1, p. 3, 11 dez. 2010.

HOARD, A. et al. Genomic Analysis of two NDM-1 *Providencia stuartii* Strains Recovered from a Single Patient. **Current Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4029–4036, 13 dez. 2020.

IWATA, S. et al. Emergence of Carbapenem-Resistant *Providencia rettgeri* and *Providencia stuartii* Producing IMP-Type Metallo-B-Lactamase in Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. February, p. 1–9, 2020.

JOENSEN, K. G. et al. Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 2410–2426, 2015.

KLEINHEINZ, K. A.; JOENSEN, K. G.; LARSEN, M. V. Applying the ResFinder and VirulenceFinder. **Bacteriophage**, v. 4, n. December, p. 1–7, 2014.

KUMAR, G. et al. Predictors and outcomes of healthcare-associated infections in COVID-19 patients. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 104, n. January, p. 287–292, mar. 2021.

LARSEN, M. V. et al. Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1355–1361, abr. 2012.

LIU, J.; WANG, R.; FANG, M. Clinical and drug resistance characteristics of *Providencia stuartii* infections in 76 patients. **Journal of International Medical Research**, v. 48, n. 10, 2020.

MEDEIROS FILHO, F. et al. A Systematic Strategy to Find Potential Therapeutic Targets for *Pseudomonas aeruginosa* Using Integrated Computational Models. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, n. September, p. 1–14, 20 set. 2021.

MOLNÁR, S. et al. Dissemination of NDM-1 carbapenemase-producer *Providencia stuartii* strains in Romanian hospitals: a multicentre study. **Journal of Hospital Infection**, v. 103, n. 2, p. 165–169, out. 2019.

OSEI SEKYERE, J.; RETA, M. A.; BERNARD FOURIE, P. Risk factors for, and molecular epidemiology and clinical outcomes of, carbapenem- and polymyxin-

- resistant Gram-negative bacterial infections in pregnant women, infants, and toddlers: a systematic review and meta-analyses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1502, n. 1, p. 54–71, 2021.
- PENG, Y. et al. Roles of Hcp family proteins in the pathogenesis of the porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* type VI secretion system. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 26816, 27 jun. 2016.
- RAKOV, C. et al. Targeting biofilm of MDR *Providencia stuartii* by phages using a catheter model. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, 2021.
- ROER, L. et al. Development of a Web Tool for *Escherichia coli* Subtyping Based on fimH Alleles. v. 55, n. 8, p. 2538–2543, 2017.
- RUS, M. et al. Distribution of NDM1 carbapenemase-producing protease strains on high-risk hospital wards. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 4751–4761, 2020.
- SCHWANKE, A. A. et al. Central venous catheter for hemodialysis: incidence of infection and risk factors. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 71, n. 3, p. 1115–1121, maio 2018.
- SU, K. et al. Genome-wide identification of genes regulated by RcsA, RcsB, and RcsAB phosphorelay regulators in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 36–41, out. 2018.
- SUGUMAR, M. et al. Detection of OXA-1 β -Lactamase Gene of *Klebsiella pneumoniae* from Blood Stream Infections (BSI) by Conventional PCR and In-Silico Analysis to Understand the Mechanism of OXA Mediated Resistance. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91800, 19 mar. 2014.
- THOMSON, N. R. et al. The Complete Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of the High Pathogenicity *Yersinia enterocolitica* Strain 8081. **PLoS Genetics**, v. 2, n. 12, p. e206, 2006.
- 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.
- VILLODRES, A. R. et al. Ultrasensitive and rapid identification of ESRI developer- and piperacillin / tazobactam-resistant *Escherichia coli* by the MALDIptaz test. **Emerging Microbes & Infections**, n. 0, p. 1–27, 2022.
- WANG, S. et al. Structure of the *Escherichia coli* FlhDC Complex, a Prokaryotic Heteromeric Regulator of Transcription. **Journal of Molecular Biology**, v. 355, n. 4, p. 798–808, jan. 2006.
- WERBROUCK, H. et al. Quantification of gene expression of *Listeria monocytogenes* by real-time reverse transcription PCR: Optimization, evaluation and pitfalls. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 2, p. 306–314, maio 2007.
- ZAVASCKI, A. P. et al. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Providencia stuartii* in an Intensive Care Unit. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 33, n. 6, p. 627–630, 2012.

6 CONCLUSÃO

Para *K.pneumoniae*:

- No período estudado, 44 isolados de *K.pneumoniae* apresentaram resistência aos carbapenêmicos e as polimixinas;
- O teste fenotípico de Carba NP apresentou ótimos resultados para a caracterização de carbapenemases nos isolados clínicos de *K.pneumoniae* de ICS;
- Os testes fenotípicos de colispot e polispot foram concordantes com os resultados genotípicos na caracterização de resistência as polimixinas;
- Os resultados do sequenciamento de KpnCRPR, mostraram que todos os isolados apresentaram os genes para carbapenemases *blaKPC-2*, *blaTEM 1D* e *blaSHV-11*;
- Todos os isolados também apresentaram o gene *mrgB* responsável pela resistência as polimixinas;
- O sequence Type 11 foi o mais frequente, seguido de ST 258;
- O sequenciamento mostrou que os isolados de KpnCRPR isolados de ICS, no período estudado, apresentaram 5 agrupamentos principais, com pequenas variabilidades genéticas nos grupos D e E.

Para *P. stuartii*:

- No período estudado foram caracterizados, por testes fenotípicos (mCim e eCim), de 21 isolados clínicos de *P. stuartii* que apresentaram resistência aos carbapenêmicos;
- O sequenciamento completo do genoma mostrou que todos os isolados de *P. stuartii* apresentaram NDM-1;
- A técnica de ERIC-PCR mostrou uma relação clonal entre os isolados;
- A análise dos dados clínicos mostrou que a maioria dos pacientes apresentaram COVID-19 e mais da metade evoluíram para óbito.

Nossos dados mostraram que estudos epidemiológicos e moleculares são importantes para uma compreensão mais profunda da diversidade da

população de microrganismos, que são úteis para inserir medidas que controlem e/ou evitem a disseminação destes patógenos no HU-UEL.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, M. et al. First report of carbapenem-resistant *Providencia stuartii* in Saudi Arabia. **New Microbes and New Infections**, v. 26, p. 107–109, 2018.

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, jul. 2014.

AHMED, M. A. E. E. et al. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance : an extended review. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, 2020.

AL-QURAINI, M. et al. Assessment of In-Vitro Synergy of Fosfomicin with Meropenem, Amikacin and Tigecycline in Whole Genome Sequenced Extended and Pan Drug Resistant *Klebsiella Pneumoniae*: Exploring A Colistin Sparing Protocol. **Antibiotics**, v. 11, n. 2, p. 1–17, 2022.

ALFEI, S.; SCHITO, A. M. β -Lactam Antibiotics and β -Lactamase Enzymes Inhibitors, Part 2: Our Limited Resources. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 4, 2022.

ALMAND, E. A.; MOORE, M. D.; JAYKUS, L.-A. Virus-Bacteria Interactions: An Emerging Topic in Human Infection. **Viruses**, v. 9, n. 3, p. 58, 21 mar. 2017.

ALQAHTANI, M. et al. Molecular detection of carbapenem resistance genes in rectal swabs from patients in Gulf Cooperation Council hospitals. **Journal of Hospital Infection**, v. 112, p. 96–103, 2021.

AYOUB MOUBARECK, C.; HAMMOUDI HALAT, D. The Collateral Effects of COVID-19 Pandemic on the Status of Carbapenemase-Producing Pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. March, p. 1–11, 2022.

BAI, F. et al. Assembly dynamics and the roles of FliI ATPase of the bacterial flagellar export apparatus. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 6528, 17 dez. 2014.

BAKTHAVATCHALAM, Y. D. et al. Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An update. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 12, p. 124–136, 2018.

BASSETTI AND PEGHIN. How to manage KPC infections. **Therapeutic Advances in Vaccines**, v. 9, n. 6, p. 259–261, 2018.

BASSETTI, M. et al. Management of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 2, p. 133–144, fev. 2018.

BENGOECHEA, J. A.; BAMFORD, C. G. *SARS* -CoV-2, bacterial co-infections, and *AMR* : the deadly trio in *COVID* -19? **EMBO Molecular Medicine**, v. 12, n. 7, p. 10–13, 7 jul. 2020.

BORTOLAIA, V. et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 12, p. 3491–

3500, 2020.

BOUEROY, P. et al. Plasmidome in mcr-1 harboring carbapenem-resistant enterobacterales isolates from human in Thailand. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2022.

BOYD, S. E. et al. OXA-48-Like β -Lactamases: Global Epidemiology, Treatment Options, and Development Pipeline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 8, p. 1–25, 16 ago. 2022.

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, 1 jul. 2004.

BREIJYEH, Z.; JUBEH, B.; KARAMAN, R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1340, 16 mar. 2020.

BUCKMAN, S. A.; TURNBULL, I. R.; MAZUSKI, J. E. Empiric Antibiotics for Sepsis. **Surgical Infections**, v. 19, n. 2, p. 147–154, 2018.

BUSH, K. Past and present perspectives on β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 10, p. 1–20, 2018.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 295–306, 2019.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, jun. 1995.

CARATTOLI, A. et al. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3895–3903, 2014.

CHANG, D. et al. Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of *Klebsiella pneumoniae* Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. December, p. 1–9, 22 dez. 2021.

CHEN, H.-Y. et al. Carbapenem-Resistant Enterobacterales in Long-Term Care Facilities: A Global and Narrative Review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. April, 23 abr. 2021a.

CHEN, J. et al. Shift in the Dominant Sequence Type of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infection from ST11 to ST15 at a Medical Center in Northeast China, 2015–2020. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 14, p. 1855–1863, maio 2021b.

CHEN, W. et al. Occurrence of blaNDM-1-Positive *Providencia* spp. in a Pig Farm of China. **Antibiotics**, v. 11, n. 6, p. 1–8, 2022.

CIRIT, O. S. et al. Aminoglycoside resistance determinants in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Turkish and

Syrian patients. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 66, n. 3, p. 327–335, 2019.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100. Wayne PA. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100. Wayne PA**, p. 282, 2018.

CONRAD, N. et al. Temporal trends and patterns in heart failure incidence: a population-based study of 4 million individuals. **The Lancet**, v. 391, n. 10120, p. 572–580, 2018.

CONTE, V. et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from invasive infections in Italy: Increasing diversity with predominance of the ST512 clade II sublineage. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 12, p. 3386–3391, 2016.

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

DE ANGELIS, G. et al. Incidence and antimicrobial resistance trends in bloodstream infections caused by ESKAPE and *Escherichia coli* at a large teaching hospital in Rome, a 9-year analysis (2007–2015). **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 9, p. 1627–1636, 9 set. 2018.

DOI, Y.; VAN DUIN, D. Polymyxin resistance in *klebsiella pneumoniae*: Complexity at every level. **Clinical Infectious Diseases**, v. 70, n. 10, p. 2092–2094, 2020.

DONG, N. et al. Genome analysis of clinical multilocus sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* from China. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 2, 1 fev. 2018.

DONG, N. et al. *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. **eBioMedicine**, v. 79, p. 103998, 2022.

DOYLE, D. et al. Laboratory Detection of Enterobacteriaceae That Produce Carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877–3880, dez. 2012.

EFFAH, C. Y. et al. *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 19, n. 1, p. 1, 9 dez. 2020.

EL-BADAWY, M. F. et al. The first Egyptian report showing the co-existence of blaNDM-25, blaOXA-23, blaOXA-181, and blaGES-1 among carbapenem-resistant *k. pneumoniae* clinical isolates genotyped by BOX-PCR. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1237–1250, 2020.

ELBEDIWI et al. Global Burden of Colistin-Resistant Bacteria: Mobilized Colistin Resistance Genes Study (1980–2018). **Microorganisms**, v. 7, n. 10, p. 461, 16 out. 2019.

ELLINGTON, M. J. et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding

acquired metallo- β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 321–322, 13 nov. 2006.

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, dez. 2017.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K. Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 9, p. 1333–1341, 2005.

FALCONE, M. et al. Efficacy of Ceftazidime-avibactam Plus Aztreonam in Patients With Bloodstream Infections Caused by Metallo- β -lactamase–Producing Enterobacterales. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. 11, p. 1871–1878, 1 jun. 2021.

FANGYOU YU, A, B JINGNAN LV, B SIQIANG NIU, C HONG DU, D BARRY N. KREISWIRTH, J L. C. crosssm Multiplex PCR Analysis for Rapid Detection of *Klebsiella*. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1–7, 2018.

FERNANDES, M. R. et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 17, p. 1–6, 28 abr. 2016.

FÖRSTER, A. et al. Coevolution of the ATPase ClpV, the Sheath Proteins TssB and TssC, and the Accessory Protein TagJ/HsiE1 Distinguishes Type VI Secretion Classes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 47, p. 33032–33043, nov. 2014.

FURLAN, J. P. R. et al. Presence of Colistin Resistance *mcr-4* Gene and Clinically Relevant Antimicrobial Resistance Genes in Sand Samples from a Public Beach. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 231, n. 7, 2020.

GASPAR, G. G. et al. Pre-and post-covid-19 evaluation of antimicrobial susceptibility for healthcare-associated infections in the intensive care unit of a tertiary hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, p. 1–4, 2021.

GAUTRET, P. et al. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 56, n. 1, p. 105949, jul. 2020.

GIURAZZA, R. et al. Emerging Treatment Options for Multi-Drug-Resistant Bacterial Infections. **Life**, v. 11, n. 6, p. 519, 3 jun. 2021.

GONG, X. et al. Molecular characterization and epidemiology of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae isolated from the Eastern region of Heilongjiang Province, China. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.

GUO, L. et al. Genomic Analysis of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 Isolates at the Respiratory Department of a Tertiary Care Hospital in Beijing, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. June, p. 1–10, 2022.

GUO, Y. et al. The Role of the Regulator Fur in Gene Regulation and Virulence of *Riemerella anatipestifer* Assessed Using an Unmarked Gene Deletion

System. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. AUG, p. 1–16, 25 ago. 2017.

HAAPALAINEN, M. et al. Hcp2, a Secreted Protein of the Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000, Is Required for Fitness for Competition against Bacteria and Yeasts. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 18, p. 4810–4822, 15 set. 2012.

HAMER, R. et al. Deciphering chemotaxis pathways using cross species comparisons. **BMC Systems Biology**, v. 4, n. 1, p. 3, 11 dez. 2010.

HENIG, O. et al. Identification of four patients with colistin-resistant *Escherichia coli* containing the mobile colistin resistance *mcr*-1 gene from a single health system in Michigan. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 40, n. 9, p. 1059–1062, 10 set. 2019.

HOARD, A. et al. Genomic Analysis of two NDM-1 *Providencia stuartii* Strains Recovered from a Single Patient. **Current Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4029–4036, 13 dez. 2020.

HOQUE, M. N. et al. Microbial co-infections in COVID-19: Associated microbiota and underlying mechanisms of pathogenesis. **Microbial Pathogenesis**, v. 156, n. January, p. 104941, jul. 2021.

HUSSEIN, N. H. et al. Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 3, p. 2897–2907, 2021.

ITO, A. et al. Stability and low induction propensity of cefiderocol against chromosomal AmpC β -lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 11, p. 3049–3052, 2018.

IWATA, S. et al. Emergence of Carbapenem-Resistant *Providencia rettgeri* and *Providencia stuartii* Producing IMP-Type Metallo- β -Lactamase in Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. February, p. 1–9, 2020.

JOENSEN, K. G. et al. Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 2410–2426, 2015.

KARAKONSTANTIS, S.; KRITSOTAKIS, E. I.; GIKAS, A. Treatment options for *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* co-resistant to carbapenems, aminoglycosides, polymyxins and tigecycline: an approach based on the mechanisms of resistance to carbapenems. **Infection**, v. 48, n. 6, p. 835–851, 2020.

KERN, W. V.; RIEG, S. Burden of bacterial bloodstream infection—a brief update on epidemiology and significance of multidrug-resistant pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 2, p. 151–157, 2020.

KING, D. T. et al. New delhi metallo- β -lactamase: Structural insights into β -lactam recognition and inhibition. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 28, p. 11362–11365, 2012.

KINOSHITA, Y. et al. Study of the structure-activity relationship of polymyxin

analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 16, p. 2713–2716, set. 2018.

KLEINHEINZ, K. A.; JOENSEN, K. G.; LARSEN, M. V. Applying the ResFinder and VirulenceFinder. **Bacteriophage**, v. 4, n. December, p. 1–7, 2014.

KUMAR, G. et al. Predictors and outcomes of healthcare-associated infections in COVID-19 patients. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 104, n. January, p. 287–292, mar. 2021.

LAI, C. et al. Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 57, n. 4, p. 106324, abr. 2021.

LAM, M. M. C. et al. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021.

LANFRANCO FATTORINI, ROBERTA CRETI, C. P. Bacterial coinfections in COVID-19: an underestimated adversary. **Ann Ist Super Sanità**, v. 47, n. 4, p. 359–364, 2020.

LARSEN, M. V. et al. Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1355–1361, abr. 2012.

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

LIAO, W.; LIU, Y.; ZHANG, W. **Virulence evolution, molecular mechanisms of resistance and prevalence of ST11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: A review over the last 10 years.** [s.l.] Taibah University, 2020. v. 23

LIU, C. et al. Molecular Epidemiology and Risk Factors of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infections in Wuhan, China. **Current Medical Science**, v. 42, n. 1, p. 68–76, 4 fev. 2022a.

LIU, J.; WANG, R.; FANG, M. Clinical and drug resistance characteristics of *Providencia stuartii* infections in 76 patients. **Journal of International Medical Research**, v. 48, n. 10, 2020.

LIU, M. C. et al. One Health Analysis of *mcr*-Carrying Plasmids and Emergence of *mcr*-10.1 in Three Species of *Klebsiella* Recovered from Humans in China. **Microbiology Spectrum**, n. October, p. 1–10, 2022b.

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, fev. 2016.

MA, W. et al. Genetic and enzymatic characterization of two novel *bla* NDM-36, -37 variants in *Escherichia coli* strains. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 42, n. 4, p. 471–480, 2023.

MACINTYRE, C. R.; BUI, C. M. Pandemics, public health emergencies and

antimicrobial resistance - putting the threat in an epidemiologic and risk analysis context. **Archives of Public Health**, v. 75, n. 1, p. 54, 14 dez. 2017.

MAIRI, A. et al. OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 4, p. 587–604, 2018.

MANCINI, S. et al. Klebsiella pneumoniae co-producing KPC and RmtG, finally targeting Switzerland. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 90, n. 2, p. 151–152, 2018.

MANCUSO, G. et al. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1310, 12 out. 2021.

MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of Klebsiella pneumoniae. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–15, 2018.

MATAR, K. M.; AL-REFAI, B. Quantification of Colistin in Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Application to a Pharmacokinetic Study. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 8198, 18 dez. 2020.

MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. D. The role of epidemic resistance plasmids and international high- risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 565–591, 2015.

MCCONVILLE, T. H. et al. CrrB Positively Regulates High-Level Polymyxin Resistance and Virulence in Klebsiella pneumoniae. **Cell Reports**, v. 33, n. 4, p. 108313, out. 2020.

MEDEIROS FILHO, F. et al. A Systematic Strategy to Find Potential Therapeutic Targets for Pseudomonas aeruginosa Using Integrated Computational Models. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, n. September, p. 1–14, 20 set. 2021.

MEĐRZYCKA-DABROWSKA, W. et al. Carbapenem-resistant klebsiella pneumoniae infections in icu covid-19 patients—a scoping review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 10, p. 1–13, 2021.

MENDES, G. et al. First Outbreak of NDM-1-Producing Klebsiella pneumoniae ST11 in a Portuguese Hospital Centre during the COVID-19 Pandemic. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, p. 1–14, 2022.

MIRZAEI, R. et al. Bacterial co-infections with <scp>SARS-CoV</scp> -2. **IUBMB Life**, v. 72, n. 10, p. 2097–2111, 8 out. 2020.

MOFFATT, J. H.; HARPER, M.; BOYCE, J. D. Mechanisms of Polymyxin Resistance. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.: s.n.]. v. 1145p. 55–71.

MOHAPATRA, S. S.; DWIBEDY, S. K.; PADHY, I. Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. **Journal of Biosciences**, v. 46, n. 3, 2021.

MOLNÁR, S. et al. Dissemination of NDM-1 carbapenemase-producer

Providencia stuartii strains in Romanian hospitals: a multicentre study. **Journal of Hospital Infection**, v. 103, n. 2, p. 165–169, out. 2019.

NANG, S. C. et al. The rise and spread of mcr plasmid-mediated polymyxin resistance. v. 45, n. 2, p. 131–161, 2020.

NANG, S. C. et al. Rescuing the last-line polymyxins: Achievements and challenges. **Pharmacological Reviews**, v. 73, n. 2, p. 679–728, 2021.

NANSHAN CHEN, MIN ZHOU, XUAN DONG, JIEMING QU, FENGYUN GONG, YANG HAN, YANG QIU, JINGLI WANG, YING LIU, YUAN WEI, JIA'AN XIA, TING YU, XINXIN ZHANG, L. Z. Characteristics of 99 Cases of 2019 Novel Coronavirus Pneumonia in Wuhan, China: A Descript study. **Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, 2020.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J.-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. NOV, p. 1–19, 26 nov. 2014.

OSEI SEKYERE, J.; RETA, M. A.; BERNARD FOURIE, P. Risk factors for, and molecular epidemiology and clinical outcomes of, carbapenem- and polymyxin-resistant Gram-negative bacterial infections in pregnant women, infants, and toddlers: a systematic review and meta-analyses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1502, n. 1, p. 54–71, 2021.

PEKER, N. et al. Diagnosis of bloodstream infections from positive blood cultures and directly from blood samples: recent developments in molecular approaches. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 9, p. 944–955, 2018.

PENG, Y. et al. Roles of Hcp family proteins in the pathogenesis of the porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* type VI secretion system. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 26816, 27 jun. 2016.

PÉREZ-GRACIA, B. S.-G. M. Present and Future of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE) Infections. **AIP Conference Proceedings**, v. 827, p. 248–261, 2019.

PHILIPPON, A. et al. Structure-based classification of class A beta-lactamases, an update. **Current Research in Translational Medicine**, v. 67, n. 4, p. 115–122, nov. 2019.

PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5873–5884, 2015.

POIREL, L. et al. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebs. pneu.* **Antimicrob. Agents and Chemother.**, v. 48, n. 1, p. 15–22, 2004.

POIREL, L. et al. Genetic Features of bla NDM-1 -Positive Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5403–5407, nov. 2011.

POIREL, L.; POTRON, A.; NORDMANN, P. OXA-48-like carbapenemases: The phantom menace. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 7, p.

1597–1606, 2012.

RAKOV, C. et al. Targeting biofilm of MDR *Providencia stuartii* by phages using a catheter model. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, 2021.

RANJAN, R.; THATIKONDA, S. β -Lactam Resistance Gene NDM-1 in the Aquatic Environment: A Review. **Current Microbiology**, v. 78, n. 10, p. 3634–3643, 2021.

RAWSON, T. M. et al. Bacterial and fungal co-infection in individuals with coronavirus: A rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing Timothy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 9, p. 2459–2468, 2020.

RHOUMA, M. et al. First identification of *mcr-1/mcr-2* genes in the fecal microbiota of Canadian commercial pigs during the growing and finishing period. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v. Volume 10, p. 65–67, 2019.

ROCH, M. et al. Characterization of Amino Acid Substitution W20S in MgrB Involved in Polymyxin Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 1, p. 1–5, 2022.

RODRIGUES, A. C. S. et al. Molecular Epidemiology of bla KPC-Encoding *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Public Hospitals in Midwest of Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 28, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 2022.

RODRÍGUEZ-SANTIAGO, J. et al. Polymyxin resistance in Enterobacterales: overview and epidemiology in the Americas. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 58, n. 5, p. 106426, nov. 2021.

ROER, L. et al. Development of a Web Tool for *Escherichia coli* Subtyping Based on *fimH* Alleles. v. 55, n. 8, p. 2538–2543, 2017.

ROZWANDOWICZ, M. et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 5, p. 1121–1137, 2018.

RUS, M. et al. Distribution of NDM1 carbapenemase-producing proteeae strains on high-risk hospital wards. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 4751–4761, 2020.

RUS, M. et al. Association of *Proteus mirabilis* and *Providencia stuartii* Infections with Diabetes. **Medicina (Lithuania)**, v. 58, n. 2, p. 1–13, 2022.

RUSSO, T. A.; MARR, C. M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 3, p. 1–42, 19 jun. 2019.

SAWA, T.; KOOGUCHI, K.; MORIYAMA, K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. **Journal of Intensive Care**, v. 8, n. 1, p. 13, 28 dez. 2020.

SCHWANKE, A. A. et al. Central venous catheter for hemodialysis: incidence of infection and risk factors. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 71, n. 3, p. 1115–1121, maio 2018.

SEGALA, F. V. et al. Impact of sars-cov-2 epidemic on antimicrobial resistance: a literature review. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 1–15, 2021.

- SHURINA, B. A.; PAGE, R. C. Structural Comparisons of Cefotaximase (CTX-M-ase) Sub Family 1. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. August, p. 1–13, 2021.
- SILVA, K. E. DA et al. Overview of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, p. 1–5, 2022.
- SOARES DE MORAES, L. et al. High mortality from carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. **Microbial Pathogenesis**, v. 167, n. April, 2022.
- SRINIVAS, P.; RIVARD, K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. **Current Infectious Disease Reports**, v. 19, n. 11, p. 38, 11 nov. 2017.
- SU, K. et al. Genome-wide identification of genes regulated by RcsA, RcsB, and RcsAB phosphorelay regulators in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 36–41, out. 2018.
- SUGUMAR, M. et al. Detection of OXA-1 β -Lactamase Gene of *Klebsiella pneumoniae* from Blood Stream Infections (BSI) by Conventional PCR and In-Silico Analysis to Understand the Mechanism of OXA Mediated Resistance. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91800, 19 mar. 2014.
- SULAYYIM, H. J. AL et al. Antibiotic Resistance during COVID-19: A Systematic Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 19, 2022.
- TAN, D. et al. Characterization of *klebsiella pneumoniae* ST11 isolates and their interactions with lytic phages. **Viruses**, v. 11, n. 11, p. 1–18, 2019.
- TESHOME, B. F. et al. Duration of Exposure to Antipseudomonal β -Lactam Antibiotics in the Critically Ill and Development of New Resistance. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 39, n. 3, p. 261–270, 7 mar. 2019.
- TETRO, J. A. Is COVID-19 receiving ADE from other coronaviruses? **Microbes and Infection**, v. 22, n. 2, p. 72–73, mar. 2020.
- THOMSON, N. R. et al. The Complete Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of the High Pathogenicity *Yersinia enterocolitica* Strain 8081. **PLoS Genetics**, v. 2, n. 12, p. e206, 2006.
- THRIFT, A. G. et al. Global stroke statistics. **International Journal of Stroke**, v. 12, n. 1, p. 13–32, 2017.
- VALIAKOS, G.; KAPNA, I. Colistin resistant mcr genes prevalence in livestock animals (Swine, bovine, poultry) from a multinational perspective. a systematic review. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 11, 2021.
- VAN DUIN, D.; DOI, Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Virulence**, v. 8, n. 4, p. 460–469, 19 maio 2017.
- VAZQUEZ-GUILLAMET, C. et al. Using the Number Needed to Treat to Assess Appropriate Antimicrobial Therapy as a Determinant of Outcome in Severe Sepsis and Septic Shock*. **Critical Care Medicine**, v. 42, n. 11, p. 2342–2349, nov. 2014.

- 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, 1991a.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerprinting of bacterial enomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991b.
- VESPERO, E. C. et al. Performance of Laboratory Methods for Detection of Polymyxin-Resistance in Gram-Negative Bacillus. **Journal of Clinical & Experimental Pathology**, v. 11, 2021.
- VILLODRES, A. R. et al. Ultrasensitive and rapid identification of ESRI developer- and piperacillin / tazobactam-resistant Escherichia coli by the MALDIptiaz test. **Emerging Microbes & Infections**, n. 0, p. 1–27, 2022.
- WANG, C.; FENG, Y.; ZONG, Z. Complete Genome Sequence of an mcr-10 - Carrying Enterobacter roggenkampii Strain Isolated from a Human Blood Culture . **Microbiology Resource Announcements**, v. 0, n. 6, p. 12–14, 2023.
- WANG, H. et al. Rapid detection of colistin resistance protein MCR-1 by LC-MS/MS. **Clinical Proteomics**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2019.
- WANG, R. et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1179, 21 dez. 2018.
- WANG, S. et al. Structure of the Escherichia coli FlhDC Complex, a Prokaryotic Heteromeric Regulator of Transcription. **Journal of Molecular Biology**, v. 355, n. 4, p. 798–808, jan. 2006.
- WANG, T. et al. Recent research and development of NDM-1 inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 223, p. 113667, nov. 2021.
- WERBROUCK, H. et al. Quantification of gene expression of Listeria monocytogenes by real-time reverse transcription PCR: Optimization, evaluation and pitfalls. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 2, p. 306–314, maio 2007.
- WU, N.; CHEN, L.; ZHU, T. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . n. January, 2020.
- WU, W. et al. NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. e00115-18, 20 mar. 2019.
- WYRES, K. L. et al. Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of Klebsiella pneumoniae. **PLOS Genetics**, v. 15, n. 4, p. e1008114, 15 abr. 2019.
- WYRES, K. L.; HOLT, K. E. Klebsiella pneumoniae as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 131–139, out. 2018.

- WYRES, K. L.; LAM, M. M. C.; HOLT, K. E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 344–359, 13 jun. 2020.
- YANG, Q. et al. Agents of Last Resort: An Update on Polymyxin Resistance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 34, n. 4, p. 723–750, 2020.
- YANG, X. et al. Carbapenem Resistance-Encoding and Virulence-Encoding Conjugative Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 65–83, jan. 2021a.
- YANG, Y. et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant and virulent plasmids in *Klebsiella pneumoniae* from patients with bloodstream infections in China. **Emerging Microbes and Infections**, v. 10, n. 1, p. 700–709, 2021b.
- YIN, Y. et al. Emergence and Transmission of Plasmid-Mediated Mobile Colistin Resistance Gene *mcr-10* in Humans and Companion Animals. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 5, p. 1–10, 26 out. 2022.
- YONG, D. et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla* NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046–5054, 2009.
- YUNGYUEN, T. et al. Nationwide Surveillance and Molecular Characterization of Critically Drug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Results of the Research University Network Thailand Study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 9, p. 1–12, 17 ago. 2021.
- ZAVASCKI, A. P. et al. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Providencia stuartii* in an Intensive Care Unit. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 33, n. 6, p. 627–630, 2012.
- ZHANG, B. et al. Treatment With Convalescent Plasma for Critically Ill Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. **Chest**, v. 158, n. 1, p. e9–e13, jul. 2020.
- ZHOU, Y. et al. Discovery of a potential MCR-1 inhibitor that reverses polymyxin activity against clinical *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae. **Journal of Infection**, v. 78, n. 5, p. 364–372, maio 2019.
- ZOABI, Y. et al. Predicting bloodstream infection outcome using machine learning. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 20101, 11 dez. 2021.
- ZOU, D. et al. A Novel New Delhi Metallo- β -Lactamase Variant, NDM-14, Isolated in a Chinese Hospital Possesses Increased Enzymatic Activity against Carbapenems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 2450–2453, abr. 2015.
- ZUSMAN, O. et al. Polymyxin monotherapy or in combination against carbapenem-resistant bacteria: Systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 1, p. 29–39, 2017.

