



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GERUSA LUCIANA GOMES MAGALHÃES

***Klebsiella pneumoniae:***

EPIDEMIOLOGIA, RESISTÊNCIA AOS CARBAPENENS E ÀS  
POLIMIXINAS E DIVERSIDADE GENÉTICA

GERUSA LUCIANA GOMES MAGALHÃES

***Klebsiella pneumoniae*:**

EPIDEMIOLOGIA, RESISTÊNCIA AOS CARBAPENENS E ÀS  
POLIMIXINAS E DIVERSIDADE GENÉTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero.

Londrina  
2019

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

Magalhães, Gersa Luciana Gomes.

*Klebsiella pneumoniae* : epidemiologia, resistência aos carbapenems e às polimixinas e diversidade genética / Gersa Luciana Gomes Magalhães. - Londrina, 2019.  
69 f. : il.

Orientador: Eliana Carolina Vespero.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2019.  
Inclui bibliografia.

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

GERUSA LUCIANA GOMES MAGALHÃES

***Klebsiella pneumoniae*:**

EPIDEMIOLOGIA, RESISTÊNCIA AOS CARBAPENENS E ÀS  
POLIMIXINAS E DIVERSIDADE GENÉTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Carolina  
Vespero  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Daniele Zendrini Rechenchoski  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof Dra. Renata Katsuko T. Kobayashi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 9 de abril de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela força que me proporcionou para concluir esta etapa da minha vida. Sou grata pelas bênçãos que recaíram não só sobre mim, mas também sobre todos os amigos, familiares e professores.

À minha orientadora Eliana Caroline Vespero pela orientação incansável, que mesmo enfrentando um período difícil de sua vida não mediu esforço para concluir meu trabalho. 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 sua dedicação, confiança e amizade sincera.

À minha família, meu esposo Renato, meus filhos Adilson Júnior e Gabriela, minha mãe Vera, minha avó Maria Benedita, minha irmãs Silvia e 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.

À professora Marsileni Pelisson pelo carinho e reconhecimento.

À professora Floristher pelo apoio e elucidações.

À professora Daniela Alfieri que contribuiu para complementar meus estudos de maneira ímpar.

Às professoras Renata Kobayashi e Daniela Rechenchoski, por aceitarem o convite de compor a banca examinadora e pelos direcionamentos das correções do trabalho.

Aos companheiros de trabalho e também amigos especiais do laboratório de microbiologia do Hospital Universitário de Londrina pela torcida e cooperações valiosas, em especial à Alice, Claudinéia, Claudinei, Emílio, Fábio, Gêneci, Ivone, Marízia, Maura, Priscila, Sidney e Sueli.

À melhor equipe e agora amigos que conquistei durante esta trajetória, Ana Daga, Luana, João Gabriel, Juliana, Polyana, Felipe e Tiago Danelli.

***Eis que tenho posto  
diante de ti uma porta  
aberta, que ninguém  
pode fechar...***

***Apocalipse 3:8***

MAGALHÃES, Gerusa Luciana Gomes. *Klebsiella pneumoniae*: epidemiologia, resistência aos carbapenens e às polimixinas e diversidade genética. 69f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

Na atualidade, a resistência aos carbapenêmicos e às polimixinas tornou-se um problema de saúde pública. Neste contexto, este trabalho teve como objetivos validar um novo teste de triagem para a detecção fenotípica de resistência às polimixinas denominado “teste da gota”. O teste foi realizado com 578 isolados de BGN, para colistina e polimixina B, nas concentrações de 2,0 µg/mL, 4,0 µg/mL e 8,0 µg/mL. Para validação do teste foram avaliadas a microdiluição em caldo (BMD) e o resultado da colistina pelo sistema de automação Vitek2<sup>®</sup>. Também foi realizada a caracterização, por testes fenotípicos, moleculares e epidemiológicos, de 57 isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenens e às polimixinas (KpRCP). Foram realizados BMD para imipenem, meropenem, colistina e polimixina B e o teste de resistência a Polimixina -Nordmann e Poirel (Pol NP). A presença das enzimas do tipo carbapenemases, ESBL CTX-M e *mcr-1* foram caracterizadas por PCR. A variabilidade genética foi realizada pela técnica de ERIC-PCR. Para os testes estatísticos foram utilizados o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS – IBM Corp., Nova York, EUA), versão 2.0 para Windows e o ambiente computacional R (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2018). O teste da gota apresentou os melhores resultados, para a colistina e polimixina B, na concentração de 4,0 µg/mL. O desempenho do teste foi medido pela *Receiver Operating Characteristic* (curva ROC) com AUC de 0,9671 e 0,9568, respectivamente para a colistina e polimixina B. A confiabilidade do teste foi avaliada pelo índice de Kappa que obteve o resultado de 0,9305 e 0,9079, respectivamente para colistina e polimixina B. Na avaliação das 57 amostras de KpRCP, 55 (96,5%) dos isolados foram positivas para o teste Pol NP. Todas as amostras transportavam o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> e em nenhuma amostra foram detectados os genes *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *mcr-1*. Para ESBL do tipo CTM-M, verificou-se a presença de 13 CTX-M-1 (22,8%), sendo que 12 (21,1%) eram CTX-M-15, 6 CTX-M-2 (10,5%), 18 CTX -M-8 (31,6%), 32 CTX-M-9 (56,1%), CTX-M-25 não foi encontrada. A técnica ERIC-PCR demonstrou uma grande variabilidade genética entre os isolados e a análise de prontuários pode constatar que 26 (45,6%) pacientes estavam internados na UTI e 27(47,4%) utilizaram previamente polimixinas. O índice de comorbidade de Charlson informou que 34 (59,8%) dos pacientes foram classificados como graves e 32 (56,1%) foram a óbito. Nossos achados sugerem que o teste da gota pode ser proposto como um teste simples, fácil e barato para a detecção de microrganismos resistentes às polimixinas. Outra contribuição deste estudo foi o conhecimento de dados epidemiológicos e moleculares sobre KpRCP, informações importantes para o monitoramento da resistência, uma abordagem ainda limitada nos serviços de saúde brasileiros.

**Palavras-chave:** *Klebsiella pneumoniae*. Polimixinas. Resistência bacteriana. Carbapenêmicos. Teste da gota.

MAGALHÃES, Gerusa Luciana Gomes. *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, resistance to carbapenems and polymyxins and genetic diversity. 69p. Dissertation (Master's degree in Clinical and Laboratory Physiopathology) - State University of Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

At present, resistance to carbapenems and polymyxins has become a public health problem. In this context, this work had as objectives to validate a new screening test for the phenotypic detection of resistance to polymyxins called "gout test". The assay was performed with 578 BGN isolates for colistin and polymyxin B at concentrations of 2.0 µg/mL, 4.0 µg/mL and 8.0 µg/mL. For the validation of the test, the broth microdilution (BMD) and the colistin result were evaluated by the Vitek2® automation system. Phenotypic, molecular and epidemiological tests of 57 *Klebsiella pneumoniae* resistant to carbapenems and polymyxins (KpRCP) were also carried out. BMD was performed for imipenem, meropenem, colistin and polymyxin B and the resistance test to Polymyxin-Nordmann and Poirel (Pol NP). The presence of the carbapenemases, ESBL CTX-M and *mcr-1* enzymes were characterized by PCR. Genetic variability was performed using the ERIC-PCR technique. The statistical test used the software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS - IBM Corp., New York, USA), version 2.0 for Windows and the R (DEVELOPMENT CORE TEAM 2018) computing environment. The gout test presented the best results for colistin and polymyxin B at the concentration of 4.0 µg/mL. The performance of the test was measured by the Receiver Operating Characteristic (ROC curve) with AUC of 0.9671 and 0.9568, respectively for colistin and polymyxin B. The reliability of the test was evaluated by the Kappa index, which obtained the result of 0.9305 and 0.9079, respectively for colistin and polymyxin B. In the evaluation of the 57 KpRCP samples, 55 (96.5%) of the isolates were positive for the Pol NP test. All samples carried the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene and in no sample were the genes *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *mcr-1* genes detected. Was observed for CTX-M ESBL the presence of 13 CTX-M-1 (22.8%), 12 (21.1%) of which were CTX-M-15, 6 CTX-M-2, 18 CTX-M-8 (31.6%), 32 CTX-M-9 (56.1%), CTX-M-25 was not found. The ERIC-PCR technique demonstrated a great genetic variability among the isolates and the medical records analysis showed that 26 (45.6%) patients were hospitalized in the ICU and 27 (47.4%) previously used polymyxins. The Charlson comorbidity index reported that 34 (59.8%) of the patients were classified as severe and 32 (56.1%) died. Our findings suggest that the gout test can be proposed as a simple, easy and inexpensive test for the detection of polymyxin-resistant microorganisms. Another contribution of this study was the knowledge of epidemiological and molecular data on KpRCP, important information for the monitoring of resistance, a still limited approach in the Brazilian health services.

**Key words:** *Klebsiella pneumoniae*. Polymyxins. Bacterial resistance. Carbapenems. Gout test.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BGN	Bacilo Gram Negativo
CAMHA	Caldo Mueller-Hinton cátion ajustado
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRE	Enterobactérias resistente aos carbapenêmicos
ITU	Infecção do Trato Urinário
HU-UEL	Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
KpRCP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos e às polimixinas
LPS	Lipopolissacarídeo
MBL	Metalobetalactamase
<i>mcr</i>	<i>mobilized colistin resistance</i>
MDR	Multirresistente
MDR-GN	Gram negativo multirresistente
MHA	Ágar Muller-Hinton
CIM	Concentração inibitória mínima
NDM	New Delhi <i>metallo</i> -beta-lactamase
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDR	Pan-drogas resistentes
Pol NP	Polimixina NP (Nordmann / Poirel)
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatística
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VIM	Verona imipenemase
IRAS	Infecção relacionada à assistência à saúde

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
2.1	<i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> .....	12
2.2	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	13
2.2.1	$\beta$ -lactamases .....	14
2.2.2	$\beta$ -lactamase de Espectro Estendido (ESBL).....	14
2.2.3	Produção de Carbapenemases .....	16
2.3	POLIMIXINAS .....	17
2.3.1	Mecanismo de Ação .....	17
2.3.2	Resistência Intrínseca das Polimixinas.....	19
2.3.3	Resistência Cromossomal às Polimixinas .....	19
2.3.4	Resistência Plasmidial às Polimixinas .....	21
2.3.5	Epidemiologia da Resistência às Polimixinas .....	22
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
3.1	OBJETIVO GERAL .....	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
4.1	AMOSTRAS .....	25
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	25
4.3	DADOS DOS PACIENTES.....	25
4.4	TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS .....	26
4.4.1	Microdiluição Automatizada.....	26
4.4.2	Microdiluição em Caldo .....	26
4.4.3	Polimixina NP (Nordmann / Poirel) .....	27
4.4.4	Teste de Diluição em Ágar (Teste da “Gota”) .....	28
4.5	EXTRAÇÃO DO DNA .....	29
4.6	DETECÇÃO DE BETA-LACTAMASES.....	29
4.7	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O GENE <i>MCR-1</i> .....	29
4.8	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE .....	30

4.9	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE, BASEADA EM SEQUÊNCIAS REPETITIVAS INTERGÊNICAS EM ENTEROBACTÉRIAS (ERIC –PCR) .....	30
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
	<b>ARTICLE 1</b> - Performance of laboratory methods for detection of polymyxin-resistance in Gram-Negative Bacillus .....	<b>34</b>
	<b>ARTICLE 2</b> - Epidemiological study of carbapenem and polymyxin-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> at the University Hospital of Londrina.....	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos em microrganismos Gram negativos teve início nos anos 60. Nos últimos anos tornou-se um problema global, visto como uma ameaça à saúde pública, previsto para causar 10 milhões de mortes anuais em todo o mundo até o ano 2050 (BAND et al., 2018). Entre as adversidades mais significativa da resistência aos antimicrobianos, estão as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (CRE), incluindo *Klebsiella pneumoniae* (HAN et al., 2017).

*K. pneumoniae* é um patógeno oportunista e uma das espécies clinicamente mais relevantes em indivíduos imunodeprimidos, responsáveis por infecções hospitalares e adquiridas na comunidade. *K. pneumoniae* é o agente causador de uma variedade de infecções incluindo pneumonias, infecções do trato urinário, tecidos moles, bacteremias, abscessos hepáticos e sepse (LEE et al., 2017). Além das altas taxas de morbidade e mortalidade, esses microrganismos estão associados ao aumento do tempo de internação e alto custo do tratamento (BARAN; NERIMAN, 2016). Em particular, *K. pneumoniae*, é um patógeno extremamente importante em infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), uma vez que pode apresentar resistência múltipla aos antimicrobianos de diferentes classes (BULIK et al., 2010; HENNEQUIN; ROBIN, 2016).

A resistência a vários antibióticos  $\beta$ -lactâmicos foi encontrada pela primeira vez em *K. pneumoniae* no ano de 1983, e essa resistência mostrou-se derivada da produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL). A prevalência de *K. pneumoniae* produtora de ESBL tem aumentado e isso tem dificultado o manejo efetivo dessas infecções (AH; KIM; LEE, 2014).

Com o surgimento de microrganismos produtores de ESBL, os antimicrobianos carbapenêmicos, como ertapenem, meropenem e imipenem, passaram a ser utilizados com mais frequência no tratamento destas infecções. No entanto, devido à pressão seletiva desenvolvida por estes antimicrobianos, tem sido observados índices crescentes de resistência a estes fármacos em uma variedade de microrganismos (BARAN; NERIMAN, 2016; ESPOSITO et al., 2017; YOUSFI et al., 2018).

Devido ao aparecimento de microrganismos resistentes aos carbapenêmicos, bem como a falta de novos antimicrobianos contra patógenos Gram negativos, foi reconsiderado o uso de antibióticos antigos para tratar estas infecções. Neste

contexto, o uso das polimixinas ressurgiu no arsenal terapêutico, principalmente para tratar infecções causadas por bactérias Gram negativas multirresistentes (MDR) (BARON et al., 2016; JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017; GIAMARELLOU, 2018).

As evidências clínicas disponíveis sugerem que o uso expandido e inadequado das polimixinas na prática clínica, levou inexoravelmente ao surgimento mundial de bactérias resistentes às polimixinas, deixando os médicos desprevenidos para tratar pacientes com infecção por microrganismos pan-drogas resistentes (PDR) (BARON et al., 2016; SRINIVAS; RIVARD, 2017; GIAMARELLOU, 2018).

Até 2015, a resistência às polimixinas estava relacionada a um mecanismo por mutação cromossomal. No entanto, um mecanismo novo de resistência mudou completamente essa visão, o recém descoberto gene *mobilized colistin resistance mcr* é codificado em um plasmídeo, e da mesma forma como na resistência cromossomal, leva à diminuição da afinidade das polimixinas pelos lipopolissacarídeos (LPS) (BARON et al., 2016).

O surgimento de cepas resistentes a estas drogas, consideradas como “último recurso” para o tratamento de pacientes com infecção por microrganismos PDR, está se tornando uma questão crítica, em um número crescente de países, devido a ambos mecanismos de resistência às polimixinas: cromossomal e plasmidial (JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017). Portanto, a rápida detecção associada à implementação de medidas eficazes de controle de infecção, são de suma importância para evitar a disseminação de *K. pneumoniae* resistente às polimixinas (BRAUN et al., 2018).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

*K. pneumoniae* faz parte da família Enterobacteriaceae, é um Gram negativo em forma de bastonete, são imóveis, geralmente capsulados, anaeróbios facultativos, não esporulam, fermentam vários carboidratos, inclusive a lactose; algumas espécies produzem urease e 2,3-butilenoglicol como produto final da fermentação da glicose (teste de Voges Proskauer) (FARMER, 1999).

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

Em 1882 *K. pneumoniae* foi descrita pela primeira vez por Carl Friedlander como uma bactéria isolada dos pulmões de pacientes que haviam morrido de pneumonia (PODSCHUN et al., 1998; PODSCHUN et al., 2001; BENGOCHEA; PESSOA, 2018). Logo em 1885 o gênero desta bactéria foi denominado *Klebsiella*, em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs (BRISSE; GRIMONT; PATRICK, 2006).

Recentemente, *K. pneumoniae* foi agrupada em um acrônimo denominado “ESKAPE”. Também fazem parte desse grupo *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*. Estes microrganismos são patógenos que representam maiores riscos aos pacientes, principalmente em ambientes hospitalares (HENNEQUIN; ROBIN, 2016; LESCAT et al., 2018).

Espécies de *Klebsiella* são consideradas patógenos oportunistas, amplamente encontrado na boca, pele e intestino, bem como em ambientes hospitalares e dispositivos médicos (LI et al., 2014). No entanto, podem se disseminar para outros tecidos causando infecções potencialmente fatais, incluindo pneumonia, infecções do trato urinário, infecções da corrente sanguínea e sepse (PACZOSA et al., 2016; BENGOCHEA; PESSOA, 2018; LEE et al., 2017; HENNEQUIN; ROBIN, 2016).

As infecções por *K. pneumoniae* são particularmente problemáticas entre neonatos, idosos e indivíduos imunocomprometidos dentro do cenário da saúde

(MAGILL et al., 2014). Este organismo também é responsável por um número significativo de infecções adquiridas na comunidade em todo o mundo. As características que definem estas infecções são a capacidade de disseminação metastática e sua significativa morbidade e mortalidade (PACZOSA et al., 2016; BENGOCHEA; PESSOA, 2018).

As IRAS causadas por *K. pneumoniae* tendem a serem crônicas devido às duas principais razões: a produção de biofilmes por *K. pneumoniae* formado *in vivo* protege o patógeno de ataques das respostas imunes do hospedeiro e antibióticos; e os isolados hospitalares de *K. pneumoniae* que frequentemente exibem fenótipos de multirresistência (LI et al., 2014).

## 2.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência aos antimicrobianos é o melhor exemplo da rápida adaptação da bactéria a um novo ecossistema. A habilidade da bactéria em ampliar seu nicho ecológico, também na presença de determinados antibióticos, pode explicar a aquisição de genes por transferência de material genético através de conjugação, transformação e transdução e/ou pelo acúmulo de mutações pontuais, levando a modificações de genes existentes (SULTAN et al., 2018). Vários mecanismos de resistência estão envolvidos, entre eles: alteração conformacional e bioquímica do sítio alvo; alteração da permeabilidade da parede celular da bactéria ao antimicrobiano; efluxo ativo; inativação enzimática do antimicrobiano (ALVES; BEHAR, 2013).

*K. pneumoniae* possui grande habilidade em adquirir plasmídeos, as cepas costumam abrigar mais de um, incluindo pequenos plasmídeos que podem conter alto ou baixo números de cópias e genes capazes de conferir resistência aos antimicrobianos (HENNEQUIN; ROBIN, 2016). Espécies de *Klebsiella* são conhecidas como reservatório de genes de resistência aos antibióticos, que podem se disseminar para outras bactérias Gram-negativas. De fato, a maioria destes genes de resistência, foram primeiramente descritos em *Klebsiella* spp (BENGOCHEA; PESSOA, 2018).

### 2.2.1 $\beta$ -lactamases

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

A produção de  $\beta$ -lactamase é o principal mecanismo de resistência a este grupo de antimicrobianos em Enterobacteriaceae. Essas enzimas, altamente diversificadas, hidrolizam  $\beta$ -lactâmicos no espaço periplasmático, evitando assim a inibição da proteína de ligação à penicilina (BLAIR et al., 2014).

Amostras de *K. pneumoniae* apresentam resistência intrínseca a ampicilina e a carbenicilina, a qual se deve à presença de genes em seu cromossomo que codificam as  $\beta$ -lactamases TEM-1 e SHV-1 (FARMER, 1999). Essas  $\beta$ -lactamases, foram descritas pela primeira vez em 1960 em amostras de *E. coli* e *Salmonella paratyphi*, logo após a introdução de ampicilina no tratamento de infeções causadas por esses microrganismos. Com isto, desde a década de 60, vem ocorrendo a disseminação da  $\beta$ -lactamase plasmidial TEM-1 para outras espécies de gram-negativas (PALZKILL, 1998). *K. pneumoniae* pode ainda produzir a enzima SHV-1 (“sulphidril variable”) em baixos níveis, o que se traduz por resistência a ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina. Cefalosporinas de primeira geração como cefalotina e cefalexina também são degradadas por estas enzimas (LIVERMORE, 1995). A introdução de  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro no uso clínico em 1978 na Europa e em 1981 nos Estados Unidos, resultou na resistência às cefalosporinas de amplo espectro. Como consequência do uso extensivo de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro, na década de 80, microrganismos que produziam  $\beta$ -lactamases mediadas pelos genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> desenvolveram ainda resistência a cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos, resultando na produção de (ESBL) (NAUMOVSKI et al., 1992; MEYER et al., 1993).

### 2.2.2 $\beta$ -lactamase de Espectro Estendido (ESBL)

ESBLs são enzimas capazes de hidrolisar todos os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, com exceção das cefamicinas (cefotaxima e cefotetan), de

carbapenêmicos (imipenem e meropenem) e de inibidores de  $\beta$ -lactamases. Sua característica fenotípica importante é que geralmente permanecem sensíveis à ação de inibidores de  $\beta$ -lactamases como sulbactam e ácido clavulânico, descritos na década de 70, e tazobactam descrito na década de 80. Esses inibidores formam um complexo protéico com a  $\beta$ -lactamase, bloqueando, desta maneira, a atividade hidrolítica dessas enzimas (HENNEQUIN.; ROBIN, 2016).

As mutações que ocorreram nos genes estruturais, que codificam as enzimas TEM e SHV, ampliaram o seu espectro de hidrólise para os betalactâmicos de 3ª geração. Estas variantes de ESBL do tipo TEM e SHV foram descritas na década de 1980, logo após a introdução das cefalosporinas de 3ª geração. Estas enzimas se espalharam com sucesso entre as cepas de *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp. e, em menor grau, em *E. coli*, causando grandes surtos hospitalares na década de 1990. Atualmente, ESBL do tipo TEM e SHV ainda são endêmicas em todo o mundo. No entanto, tendem a ser superados em número pela ESBL, referida como CTX-M, considerada a principal enzima observada atualmente em *K. pneumoniae* e descrita pela primeira vez no início da década de 1990 (BLAIR et al., 2014; HENNEQUIN; ROBIN, 2016). As  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M pertencem a um grupo heterogêneo de classe molecular A com um sítio ativo de serina, que inclui pelo menos cinco grupos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M- 25 (CANTÓN; COQUE, 2006; D'ANDREA et al., 2013).

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

A disseminação de bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases do tipo ESBL e do tipo AmpC em Enterobacteriaceae comprometeu a susceptibilidade das cefalosporinas em muitas áreas do mundo e levou ao aumento do uso de carbapenens que eram antibióticos estáveis e potentes contra estas enzimas. O uso intenso de carbapenêmicos resultou no surgimento de Enterobacteriaceae resistente a estes fármacos. Tais resistências foram observadas no final da década de 90

(BARAN; NERIMAN, 2016; BULIK, 2010; HENNEQUIN; ROBIN, 2016; TIAN et al 2018).

### 2.2.3 Produção de Carbapenemases

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

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

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

As carbapenemases mais frequentes em *K. pneumoniae* são as enzimas *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), uma enzima capaz de hidrolisar um amplo espectro de  $\beta$ -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. A enzima KPC foi isolada pela primeira vez em 1996, e desde então, o cenário tornou-se alarmante devido ao seu alto potencial de disseminação, uma vez que a localização em plasmídios facilita a transferência de genes específicos (BARAN; NERIMAN, 2016; KIM., et al 2018). Vinte e quatro

variantes de KPC (KPC-2 a KPC-24) foram identificadas, as quais apenas diferem por algumas mudanças nos aminoácidos, dessas variantes, sendo a KPC-2 a carbapenemase mais frequente (PALZKILL, 2018).

Os isolados produtores da enzima KPC também se espalharam pelo mundo todo. Em alguns países, como Israel, Grécia, Brasil e Colômbia, são endêmicos, enquanto em outros, como Austrália, Nova Zelândia e no Canadá, geralmente são importados de outros países (CODJOE; DONKOR, 2018; GIAKKOUPH et al., 2011; HENNEQUIN; ROBIN, 2016).

O Programa Global de Vigilância Antimicrobiana (SENTRY) documentou um aumento significativo nas taxas de resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae* nos centros médicos brasileiros de 1997 a 1999 e 2008 a 2010 (GALES et al., 2012). Estes achados também concordaram com outro estudo recente que documentou um aumento nas taxas de resistência a carbapenêmicos, de 6,8% a 35,5%, em 3085 isolados de *K. pneumoniae* obtidos de hospitais brasileiros entre os anos de 2011 e 2015. Este aumento tem sido atribuído principalmente à disseminação de isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2 (BRAUN et al., 2018).

As infecções por *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos continuam a ser um desafio significativo associado à morbidade e mortalidade em todo o mundo. Na atualidade poucos antimicrobianos retêm atividade contra estes microrganismos, que incluem aminoglicosídeos, tigeciclina, ceftazidima e avibactam. Além disso, as polimixinas, incluindo a colistina, são importantes opções de tratamento (ROJAS et al., 2017).

## 2.3 POLIMIXINAS

### 2.3.1 Mecanismo de Ação

As polimixinas são antimicrobianos polipeptídicos, descobertos em 1947 como produto do metabolismo do microrganismo Gram-positivo de solo *Paenibacillus polymyxa* (anteriormente chamado de *Bacillus polymyxa*). A classe dos antimicrobianos polimixina e colistina (também conhecido como polimixina B e polimixina E), compartilham semelhanças no mecanismo de ação e espectro de atividade (SRINIVAS; RIVARD, 2017). A única diferença apresentada na sua

estrutura química é a presença de um aminoácido D-leucina na molécula de colistina na mesma posição onde existe um D-fenilalanina na molécula da polimixina B. A polimixina B é utilizada na forma de sulfato de polimixina B, enquanto a colistina é uma pró-droga, utilizada na forma de colistimetato de sódio que, após ser metabolizado, é transformado em colistina base, que é o princípio ativo do fármaco (AH; KIM; LEE, 2014; GALES; JONES, 2011).

As polimixinas foram originalmente introduzidas na década de 1950 para o tratamento de infecções por microrganismos Gram-negativos, mas deixaram de ser utilizadas em meados da década 1970, devido às altas taxas de nefrotoxicidade e neurotoxicidade em paralelo ao surgimento de alternativas de tratamento menos tóxicas (AH; KIM; LEE, 2014; KINOSHITA et al., 2018; YOUSFI et al., 2018).

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

A atividade antibacteriana das polimixinas baseia-se na interação eletrostática entre antimicrobianos polipeptídicos catiônicos e porções carregadas negativamente, presentes no lípido A do LPS, que formam a membrana externa de bactérias Gram-negativas (ESPOSITO et al., 2017). O LPS compreende 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 I-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 - desestruturando a membrana externa e, finalmente, resultando em vazamento citoplasmático e morte celular (ESPOSITO et al. 2017; SRINIVAS; RIVARD, 2017; KINOSHITA et al., 2018).

### 2.3.2 Resistência Intrínseca das Polimixinas

Às polimixinas não têm atividade contra microrganismos anaeróbios e Gram positivos, isto ocorre devido à ausência da membrana externa de LPS. Além disso, uma variedade de Gram negativos é naturalmente resistente às polimixinas, incluindo *Brucella* spp., Complexo *Burkholderia cepacia*, *Edwardsiella* spp., *Morganella morganii*, *Proteus* spp. *Providencia* spp. e *Serratia* spp. (BLAIR et al., 2014; ESPOSITO et al., 2017). Acredita-se que o mecanismo desta resistência natural seja devido a fatores de expressão gênica constitutiva que resultam na adição de moléculas catiônicas ao LPS, levando à diminuição da afinidade de ligação no local de ação da polimixina no LPS (SRINIVAS; RIVARD, 2017). Até a data, nenhum determinante de resistência transferível de microrganismos naturalmente resistente às polimixinas foi descrito, contudo infecções que envolvem estas espécies e que carregam gene de carbapenemase, possuem poucas ou nenhuma opção de agentes terapêuticos disponíveis para tratamento (AH; KIM; LEE, 2014).

### 2.3.3 Resistência Cromossomal às Polimixinas

Os patógenos Gram negativos naturalmente susceptíveis às polimixinas, podem adquirir mutações nas vias celulares que levam à modificação do LPS, resultando em resistência a estes fármacos. A modificação ocorre principalmente através da adição de moléculas catiônicas, 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N), e fosfoetanolamina (PEtN) aos componentes do LPS A ou do ácido 3-desoxi-D-manno-octulosônico (Kdo), são alterações mediadas por via cromossomal, portanto esta resistência não é gerada por transferência horizontal de genes entre espécies de bactérias (AH; KIM; LEE, 2014; ESPOSITO et al., 2017; SRINIVAS; RIVARD, 2017).

Os operons *arnBCADTEF* (também conhecido 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 que regulam os operons *arnBCADTEF* e *pmrE* para sintetizar L-Ara4N para adição ao LPS (SRINIVAS ; RIVARD, 2017).

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 (BARON et al., 2016; JEANNO; BOLARD; PLÉSIAT, 2017).

Em *K. pneumoniae*, a resistência às polimixinas é induzida por compostos catiônicos como polimixinas, onde estímulos ambientais, como baixas concentrações de Mg<sup>2+</sup>, pH ácido e altas concentrações de Fe<sup>3+</sup>, 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 sistema componente (TC) PmrAB também é ativado pelo PhoPQ através do produto do gene *pmrD*, além disso, o operon *arnBCADTEF* pode ser ativado diretamente por PhoP (AH; KIM; LEE, 2014; FALAGAS; RAFAILIDIS; MATTHAIOU, 2010). Evidências acumulam-se sobre o papel 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 quinase de PhoQ, cuja inativação aumenta a resistência às polimixinas. Seja qual for o acontecimento 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 (BARON et al., 2016; ESPOSITO et al., 2017; JEANNOT et al., 2017; OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014; SRINIVAS; RIVARD, 2017). Por outro lado, os altos de níveis de CIMs de colistina exibida 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 suportam a hipótese de que vias ou mecanismos específicos da cepa podem estar envolvidos na resistência às polimixinas. O sensor mutado CrrB ativa PmrAB através de um conector recentemente caracterizado, denominado CrrC, que não contribui, mas é necessário para a resistência mediada por CrrB às polimixinas (HENNEQUIN, C.; ROBIN, 2016; JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017; POIREL et al., 2015; SRINIVAS; RIVARD, 2017).

### 2.3.4 Resistência Plasmidial às Polimixinas

Até recentemente, a resistência às polimixinas estava sempre ligada a um mecanismo cromossomal, no entanto um novo mecanismo de resistência mudou completamente essa visão. Em novembro de 2015, Liu et al. descreveram pela primeira vez a resistência adquirida à colistina em *E. coli* da comunidade da China, em animais e seres humanos, atribuído ao gene *mcr-1*, mediado por plasmídeo (LIU et al., 2016). Este gene codifica uma fosfoetanolamina transferase que catalisa a adição de uma PEtN ao lipídio A, levando à diminuição da afinidade da colistina pelo LPS (GIAMARELLOU, 2016; ESPOSITO et al., 2017; AURÉLIE et al., 2018). Após a descoberta do primeiro gene que confere resistência às polimixinas, novos genes foram detectados e nomeados de *mcr-2* ao *mcr-8*. Estes genes descritos globalmente, foram isolados de animais e seres humanos (LIU et al., 2016; SUN et al., 2018; YANG et al., 2018).

O gene *mcr-1*, de 1626 pb, foi transportado num plasmídeo do tipo IncI2. A análise dos aminoácidos do *mcr-1* mostrou que ele estava intimamente relacionado com o PEtN transferase, encontrado em *Paenibacillus* spp., mesmo microrganismo do qual os antibióticos polimixinas foram (BARON et al., 2016).

Poucos meses após o primeiro relato do gene plasmidial *mcr-1*, a resistência transferível à colistina foi em vários países, incluindo a Europa, Ásia, América do Sul, América do Norte e África. Também foi relatado em diversos gêneros bacterianos (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* e *Enterobacter*), mas principalmente de *E. coli*. (SRINIVAS; RIVARD, 2017; WANG et al., 2018). Embora tenha sido detectado e identificado pela primeira vez no final de 2015, outro estudo do mesmo grupo anunciou sua presença em coleções de *E. coli* resistentes à colistina nos anos 80, enquanto os registros mais antigos da Europa são de 2005 (França) e 2009 (Países Baixos) (BARON et al., 2016).

Por outro lado a colistina tem sido amplamente utilizada em medicina veterinária há décadas, como um tratamento curativo e uma droga profilática, administrada na alimentação de suínos e aves como promotor de crescimento. O sulfato de colistina também é utilizado na indústria de frutos do mar para promover o crescimento de peixes. Acredita-se que o uso extensivo de colistina em animais resultou em alta pressão seletiva no ambiente veterinário, promovendo o surgimento desse novo plasmídeo. Devido a esta suposição a China proibiu o uso de colistina

como aditivo alimentar para animais, que levaram à retirada de 8000 toneladas de colistina na medicina veterinária (GIAMARELLOU, 2016; YANG et al., 2018). No Brasil, o Laboratório Central (Lacen) passou a pesquisar este gene em amostras de humanos, tendo detectado o primeiro caso em dezembro de 2016. Seis meses após o primeiro caso, já existiam 12 isolados em humanos no Paraná. Diante deste cenário, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) publicou no Diário Oficial da União, em 30 de novembro de 2016, a Instrução Normativa 45 proibindo o uso da colistina como promotor de crescimento a ser usado na alimentação animal (IN 45, MAPA 2016).

O uso crescente de colistina na medicina humana e a recente descoberta da resistência mediada por via plasmidial, destacam a necessidade de métodos confiáveis e rápidos para o teste de susceptibilidade às polimixinas e adoção de medidas contínuas de prevenção para controlar a disseminação de microrganismos multirresistentes (AURÉLIE et al., 2018).

### 2.3.5 Epidemiologia da Resistência às Polimixinas

As taxas de resistência às polimixinas ainda são baixas em alguns países, mas estão aumentando constantemente em outros e têm sido relatadas em várias regiões do mundo, incluindo Europa, América do Norte, América do Sul, Ásia e África do Sul (AH; KIM; LEE, 2014; BARON et al., 2016; GIAMARELLOU, 2016; SRINIVAS; RIVARD, 2017). A resistência às polimixinas é mais crítica em *K. pneumoniae* do que em *E. coli*, com altas taxas relatadas para essa espécie na Europa pelo Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) (8,2% em 2014). No entanto, alguns países europeus são mais profundamente impactados do que outros por *K. pneumoniae* resistente às polimixinas, como a Romênia (25,8%), Grécia (19,9%) e Itália (15,4%) (JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017).

De acordo com o SENTRY, as taxas de resistência global às polimixinas para *K. pneumoniae* atingiram (1,5%) no período 2009-2012. A maior taxa foi encontrada na América Latina (2,1%), seguida da América do Norte (1,8%). A resistência na América Latina aumentou gradualmente de (1,3%) em 2006, para (3,0%) em 2009. Taxas de resistência à colistina particularmente altas (20–55.2%) foram relatadas em pacientes da unidade de terapia intensiva (UTI) na América Latina (AH; KIM; LEE, 2014; SRINIVAS; RIVARD, 2017).

No Brasil, as taxas de resistência à polimixina B aumentaram significativamente, variando de 0 a 30,6% entre 2009 e 2015. Estes resultados concordam com estudos anteriores que também descreveram taxas crescentes de resistência à polimixina (23% a 49,7%) em isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase (BRAUN et al., 2018). No HU-UEL foi realizado um estudo no período de maio de 2016 à janeiro de 2018 com 1101 cepas de *K. pneumoniae*, sendo que 132 (12%) eram resistente às polimixinas, resultados avaliados pelo sistema automatizado VITEK®2 (*bioMérieux*) (MORAIS et al, 2018).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Validar um teste fenotípico para a detecção laboratorial de resistência às polimixinas em Bacilos Gram Negativos e determinar as características epidemiológicas, moleculares de isolados clínicos de KpRCP, de pacientes do Hospital Universitário de Londrina.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os carbapenêmicos e polimixinas por microdiluição em caldo;
- Avaliar os resultados da colistina obtidos pelo sistema automatizado Vitek 2®;
- Validar por testes estatísticos o teste da “gota” para detecção de resistência às polimixinas;
- Analisar as características epidemiológicas e clínicas dos pacientes que tiveram infecção por *K. pneumoniae* resistentes às polimixinas, nos anos de 2016-2017;
- Avaliar a sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de KpRCP;
- Analisar o teste por NP para determinar a resistência à polimixina;
- Pesquisar por PCR a presença do gene *mcr-1*;
- Caracterizar por PCR a presença dos genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos;
- Avaliar a diversidade genética dos isolados clínicos de KpRCP, através da reação em cadeia da polimerase, baseada em sequências repetitivas intergênicas em enterobactérias (ERIC –PCR).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS

Trata-se de um estudo transversal, retrospectivo, descritivo. Foram incluídas neste estudo 578 amostras de isolados de BGN (Bacilo Gram negativo) de diversos materiais clínicos, de pacientes atendidos no ambulatório, pronto socorro e internados no HU-UDEL, no período de 2016 a 2018. As amostras foram previamente identificadas pelo sistema VITEK® 2 (bioMérieux) e armazenadas em ágar nutriente (temperatura ambiente) e em TSB (*Tryptic Soy Broth*) com glicerina 15% (-20°C), até a realização dos testes.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina CAAE 43013315.8.0000.5231.

### 4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram selecionados Isolados de Bacilo Gram Negativo (BGN) de pacientes atendidos no ambulatório, pronto socorro e internados no HU-UDEL. Foi incluído no estudo um isolado por paciente, considerado proveniente de infecção segundo critérios de diagnóstico do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (CDC, 2019).

### 4.3 DADOS DOS PACIENTES

Foram coletados dados demográficos de 57 pacientes com infecção por KpRCP, incluindo idade, gênero, comorbidades e uso prévio de antibióticos, dos prontuários médicos dos pacientes, cedidos para consulta pelo Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do HU-UDEL.

## 4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

### 4.4.1 Microdiluição Automatizada

Para a identificação dos isolados utilizou-se o cartão VITEK<sup>®</sup> 2 GN ID e o cartão VITEK<sup>®</sup>2 AST 239 e/ou 238 para avaliação do teste de sensibilidade aos antimicrobianos. A interpretação foi realizada de acordo com os critérios do CLSI 2017 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

### 4.4.2 Microdiluição em Caldo

*Preparo da droga:* 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. Utilizamos água de injeção como solvente e diluente de acordo com as instruções do (CLSI).

*Preparo dos isolados:* as amostras foram preparadas em 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).

*Preparo das placas:* Os testes foram realizados em placas de poliestireno e 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 a pipeta multicanal, transferimos 50 µL da primeira coluna para a segunda coluna, homogeneizando três vezes, transferindo 50 µL da segunda coluna 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).

*Aplicação do inóculo:* Foi adicionado o conteúdo do tubo Falcon com o inóculo em uma placa grande vazia e estéril, de forma que foi possível pipetar o conteúdo com a multicanal. Foi pipetado 50 µL e aplicado na linha correspondente ao número da amostra pipetada pulando o poço CE. Após adicionado todas as amostras, foi homogeneizado a placa com cuidado, incubado a 37°C por 18 a 24h e anotado o

horário de finalização. 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.

Utilizamos os pontos de corte recomendados pela ANVISA, na Nota Técnica Nº 01/2010, para avaliar a suscetibilidade (polimixina B e colistina: suscetível  $\leq 2 \mu\text{g} / \text{mL}$  e resistente  $\geq 4 \mu\text{g} / \text{mL}$ , imipenem e meropenem: suscetível  $\leq 1 \mu\text{g} / \text{mL}$ , intermediário  $2 \mu\text{g} / \text{mL}$  e resistente  $\geq 4 \mu\text{g} / \text{mL}$ ).

#### 4.4.3 Polimixina NP (Nordmann / 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 6,25 g de CAMHA e 0,0125 g de vermelho de fenol. Corrigindo o pH para 6,7 utilizando HCl 1N. Essa solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos (após autoclavação, acertado o volume da solução para 225 mL utilizando água destilada). Após essa solução atingir 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 então 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  $35 \pm 2$  ° C.

A microplaca foi incubada em estufa bacteriológica  $35 \pm 2$  °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.

#### 4.4.4 Teste de Diluição em Ágar (Teste da “Gota”)

*Preparo da solução mãe de colistina e polimixina B:* Foi preparada uma solução do fármaco na concentração de interesse ( $128 \mu\text{mL}$ ), pesquisado a potência no laudo de análise do lote que foi fornecido pelo fabricante para a pesagem e verificando o solvente e o diluente no Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

*Preparo da solução de colistina ou polimixina B com concentração de  $8.0 \mu\text{g/mL}$ :* Foi adicionado 0,5 mL da solução mãe em 7,5 mL de MHB cátion ajustado.

*Preparo da solução de colistina ou polimixina B com concentração de  $4.0 \mu\text{g/mL}$ :* Foi adicionado 0,250 mL de Solução mãe em 7,750 mL e MHB cátion ajustado.

*Preparo da solução de colistina ou polimixina B com concentração de  $2.0 \mu\text{g/mL}$ :* Foi adicionado 0,125 mL de Solução mãe em 15,875 mL e MHB cátion ajustado.

*Preparo da bactéria:* Foi realizado uma suspensão das colônias de bactéria em 3 mL de salina estéril (0,9%) obtendo a escala 0,5 de McFarland. A suspensão da bactéria foi espalhada em toda superfície de uma placa de petri, contendo meio de MHA, com o auxílio de um *swab* alginatado. Após, foram dispensados  $10 \mu\text{L}$  de colistina e polimixina, nas concentrações de 2, 4 e  $8 \mu\text{g/mL}$  e incubadas a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  por 18 à 24 h.

A CIM foi definida como a menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento do microorganismo. Utilizamos os pontos de corte recomendados pela

ANVISA, na Nota Técnica Nº 01/2010, para avaliar a suscetibilidade (polimixina B e colistina: suscetível  $\leq 2 \mu\text{g} / \text{mL}$  e resistente  $\geq 4 \mu\text{g} / \text{mL}$ ).

#### 4.5 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA foi preparado para PCR usando o método de fervura. De três a 5 colônias da bactéria crescidas em ágar Luria (LA), foram suspensas em 0,5 mL de água ultra pura e fervido durante 10 minutos, seguido de choque térmico por 5 minutos. A suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado.

#### 4.6 DETECÇÃO DE BETA-LACTAMASES

As amostras que apresentaram o teste fenotípico positivo para carbapenemsases foram caracterizadas genotipicamente por PCR. A PCR para a pesquisa do gene *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *MCR-1* foi realizada de acordo com Monteiro (2002). A reação foi submetida a 94 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 58 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Foi realizada a técnica de PCR multiplex, através do TopTaq® Master Mix Kit (QIAGEN®), com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de 25 segundos a 94 °C de desnaturação, 40 segundos a 52 °C para anelamento e 50 segundos a 72 °C de extensão e um alongamento final de 6 minutos a 72°C para os genes *bla*<sub>CTX-M1</sub>, *bla*<sub>CTX-M2</sub>, *bla*<sub>CTX-M8</sub>, *bla*<sub>CTX-M9</sub> e *bla*<sub>CTX-M25</sub> (WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006). A PCR para a pesquisa do gene *bla*<sub>CTX-M15</sub> foi realizada de acordo com Leflon-guibout et al. (2004). A reação foi submetida a 30 ciclos de 94 °C por 7 minutos, 94 °C por 1 minutos, 50 °C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72 °C por 6 minutos. Os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 1.

#### 4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O GENE *MCR-1*

Os ensaios de PCR para o gene *mcr-1* foram realizados com os seguintes iniciadores: CLR5-F (5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3') e CLR5-R (5'-

CTTGGTCGGTCTGTA GGG-3'), como descrito por Liu et al. (2016). Cada reação de 25 µL contém: 10 µL DNA molde, 1 µL (0,8 pmol) de cada primer, 0,5 µL (10 Mm) da mistura de dNTP (Invitrogen), 0,2 µL (5 U/µL) *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 2,5 µL do tampão 10X (Invitrogen), e 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> (2,5 Mm) (Invitrogen). A reação foi realizada no termociclador Hybaind e nas seguintes condições dos ciclos: um ciclo de 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 58 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

#### 4.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos da reação de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,0% em solução de Tris/Borato/EDTA (TBE) 1x. Na aplicação no gel de agarose foram adicionados 4 µL de tampão de amostra. A eletroforese foi realizada a 80 volts, por 40 minutos. O marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. Após a corrida o gel foi adicionado à solução de brometo de etídio (0,08 µL/100 mL) por 15 minutos e visualizado em luz ultravioleta.

#### 4.9 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE, BASEADA EM SEQUÊNCIAS REPETITIVAS INTERGÊNICAS EM ENTEROBACTÉRIAS (ERIC –PCR)

A reação de PCR foi realizada 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). O aparelho foi ajustado para 100 v e 400 mA. A análise foi realizada pela coloração do gel com brometo de etídio (0,5 µg/mL),

visualização em transiluminador com lâmpada ultravioleta e posteriormente fotografado para documentação.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados categóricos foram demonstradas através de frequência e percentual. A análise foi realizada pelo teste de Qui-quadrado ou teste Exato de Fischer, quando necessário. O nível de significância alfa estipulado foi igual a 0,05. As análises dos dados foram realizadas com o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS – IBM Corp., Nova York, EUA), versão 20 para Windows.

Foram utilizados os pacotes pROC e epiR para traçar curvas receiver-operating-characteristic (ROC) e para calcular a área sob a curva ROC (AUC) e na análise de concordância foi utilizado o Coeficiente Kappa de Cohen. A discriminação foi avaliada pela AUC, comparando as duas AUCs pelo teste de DeLong. O método de bootstrap não paramétrico pode ser usado para simular situações do mundo real, bem como para validar os testes. A partir dos dados obtidos no presente estudo, foram geradas aleatoriamente 10000 amostras bootstrap do mesmo tamanho, obtidas por reamostragem e substituição de cada amostra, para teste de validação. Os testes foram bicaudais e um nível alfa de 0,05 indicou resultados estatisticamente significativos. Para estas análises estatísticas foi utilizado o ambiente computacional R (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2018).

**Tabela 1** - Genes codificadores das enzimas *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>MCR-1</sub> *bla*<sub>CTXM</sub>, sequência dos oligonucleotídeo e tamanho do fragmento amplificado.

<b>Enzima</b>	<b>Gene</b>	<b>Sequências</b>	<b>Pares de base</b>
<b>KPC</b>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT	850
		TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC	
<b>NDM</b>	<i>bla</i> <sub>ndm</sub>	TTGGCGATCTGGTTTTCC	195
		GGT TGA TCT CCT GCT TGA	
<b>OXA-48</b>	<i>bla</i> <sub>oxa-48</sub>	GCTTGATCGCCCTCGATT	744
		GAT TTG CTC CGT GGC CGA AA	
<b>VIM</b>	<i>Bla</i> <sub>vim</sub>	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A	390
		CGA ATG CGC AGC ACC AG	
<b>MCR</b>	<i>mcr-1</i>	CGG TCA GTC CGT TTG TTC	350
		CTT GGT CGG TCT GTA GGG	
<b>CTX-M-1</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M1</sub>	AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC	415
		AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT	
<b>CTX-M-2</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M2</sub>	CGA CGC TAC CCC TGC TAT T	552
		CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG	
<b>CTX-M-8</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M8</sub>	TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC	666
		AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	
<b>CTX-M-9</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M9</sub>	CAA AGA GAG TGC AAC GGA	205
		ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC	
<b>CTX-M-25</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M25</sub>	GCA CGA TGA CAT TCG GG	327
		AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	
<b>CTX-M-15</b>	<i>bla</i> <sub>CTX-M15</sub>	ATA AAA CCG GCA GCG GTG	483
		GAA TTT TGA CGA TCG GGG	

## 5 RESULTADOS

Os resultados deste estudo estão apresentados em dois artigos:

### ARTIGO 1

Performance of laboratory methods for detection of polymyxin-resistance in Gram Negative Bacillus

### ARTIGO 2

Epidemiological study of carbapenem and polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae* at the University Hospital of Londrina

## ARTICLE 1 - Performance of laboratory methods for detection of polymyxin-resistance in Gram-Negative Bacillus

### Abstract

**Background:** The emergence of multi-resistant Gram negative microorganisms (MDR) combined with the lack of new antimicrobials has been recognized worldwide as a significant concern. It is in this context that the use of colistin resurfaced, mainly due to infections caused by multiresistant Gram negative bacteria. In this study we evaluated a new screening method named "gout test", capable of detecting resistance to polymyxins during antimicrobial susceptibility testing by agar dilution test. We compared and analyzed the phenotypic tests of broth microdilution, agar dilution (gout test), and Vitek 2<sup>®</sup> automated system. A total of 578 bacterial strains were used in this study, including *A. baumannii* 244 (42.2%), *P. aeruginosa* 108 (18.7%), *K.pneumoniae* 214 (37%), *E. coli* 3 (0.5%) and *Enterobacter* spp 9 (1, 6%). The gout test was evaluated in three concentrations: 2.0 µg / mL, 4.0 µg / mL and 8.0 µg / mL.

**Results:** In the evaluation of broth microdilution (BMD) for all microorganisms studied, 420 were shown to be colistin sensitive and 158 colistin resistant and 423 sensitive and 155 resistant to polymyxin B. The performance of Vitek 2<sup>®</sup> automated system identified 429 isolates susceptible and 149 colistin resistant. The test performance of the gout test was measured to colistin by the AUC ROC curve of 0.9302 (2.0 µg / mL), 0.9671 (4.0 µg / mL), 0.9149 (8.0 µg / mL) and the Kappa index 0,7916 (2.0 µg / mL), 0.9305 (4.0 µg / mL), 0.8639 (8.0 µg / mL). We also calculated the gout test for polymyxin B AUC ROC curve of 0.9422 (2.0 µg / mL), 0.9568 (4.0 µg / mL), 0.9142 (8.0 µg / mL). Kappa index had results of 0.8268 (2.0 µg / mL), 0.9079 (4.0 µg / mL), 0.8772 (8.0 µg / mL). The results of all isolates for Vitek 2<sup>®</sup> the ROC curve being AUC was 0.9541 and 0.9049 Kappa index.

**Conclusions:** We observed that the concentration of the colistin and polymyxin B gout test of 4.0 µg / mL had similarly higher results than the Vitek 2<sup>®</sup> system. The gout test can be used with confidence in the practice of clinical laboratories. This study emphasizes that the gout test is an alternative screening that shows simple phenotypes method; is easy-to-interpret and a cost-effective technique, which can be easily implemented in clinical microbiological practice to detect resistance to polymyxins.

**Key-words:** gout test, polymyxins, resistance, broth microdilution, detection method.

## Introduction

Infections due to multidrug-resistant Gram negative (MDR-GN) bacteria, especially carbapenem resistant isolates, are increasingly reported in health care facilities, being responsible for nosocomial infections that may lead to fatal outcomes due to limited therapeutic options [1–3]. Carbapenem resistant Gram negative bacteria infections remain a significant challenge associated with morbidity and mortality worldwide [4, 5]. *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*, along with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* are among the most common MDR microorganisms now encountered in the clinical setting, and treating and managing them is a challenging task [6].

The increasing prevalence of (MDR-GN) has led to the accumulation of reports on clinical use polymyxins borne out of necessity [7]. These typically involve critically ill patients where the polymyxins are used as salvage therapy, either alone or in combination. The increasing use of colistin in human medicine, and the recent discovery of plasmid-mediated polymyxin resistance, highlight the need for reliable methods for polymyxin susceptibility testing [8].

The Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) recently gathered in a joint subcommittee, chose the broth microdilution (BMD) method as the reference method. However, manufacturing BMD panels is laborious to be performed in a clinical laboratory routine and, the commercial BMD panels available are expensive for many hospitals. Automated dilution methods such as those performed by the VITEK® 2 (bioMérieux) system could be an alternative for the screening of colistin resistance for laboratories that cannot perform manual BMD [9].

Recently, the Brazilian Ministry of Health published a National Action Plan for Prevention and Control of Antimicrobial Resistance in the healthcare field (PAN-BR). As one of the guidelines is the improvement of surveillance and monitoring of MDR in the field of human health in order to guide clinical treatment protocols and assess epidemiological trends. Therefore, due to the worldwide spread of resistance to polymyxins antimicrobial class, including chromosomal and / or plasmid mechanisms, phenotypic screening methods are required for routine laboratory detection [10].

In clinical laboratory, the bacterial resistance of the antimicrobial class of polymyxins is underestimated, probably due to the difficulties of the easy method for detecting this resistance. In addition, susceptibility testing guidelines do not have established cut-off points for the diffusion (Kirby-Bauer) technique for the detection of polymyxin resistance. The small clinical laboratories do not have an automated system for analysis of antimicrobial susceptibility and BMD is painful. In this context we identified the importance of a screening test to presume resistance to polymyxins.

In this study we evaluated the performance of a new screening test (*gout test*) that can be deployed, for laboratory detection of resistance to polymyxins, during antimicrobial susceptibility testing routine, by agar dilution test (Kirby-Bauer). We also compared the performance of this new test with Vitek-2™ (bioMérieux, Marcy-L'Étoile, France) automated system on determination of colistin susceptibility and with gold standard broth microdilution method.

## **Materials and Methods**

### *Bacterial Isolates*

This study was performed in the clinical microbiology laboratory from University Hospital of State University of Londrina (HU-UEL). We evaluated 521 consecutive isolates from *A.baumannii*, *P.aeruginosa* and Enterobacteriaceae. We performed the BMD for colistin and polymyxin B for each specimen, from April to December 2018. Also included were 57 polymyxin resistant *K. pneumoniae*, previously isolated during 2016-2017. The isolates were identified using VITEK® 2 (bioMérieux –France) and profile susceptibility was determined with AST 239/238 card. The interpretation was performed according the CLSI 2018 criteria. The samples were stored in TSB (Tryptic Soy Broth) with 15% glycerol and colistin (- 20 °C), until the tests were carried out.

### *Broth Microdilution*

Broth microdilution was performed to determine polymyxin B (Bedfordpoly-B, polymyxin B sulfate) and colistin (Sigma, colistin sulfate Salt) MICs in cation-adjusted Mueller Hinton II broth according to CLSI guidelines. The broth microdilution panels

were examined and results were interpreted after incubation for 16-20 hours at 35°C. *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were included as control strains [11].

#### *Dilution in agar (gout test).*

Colistin (Sigma, colistin sulfate Salt) and polymyxin (Bedfordpoly-B, polymyxin B sulfate) solutions were prepared at concentrations of 2.0 µg / mL, 4.0 µg / mL and 8 µg / mL, according CLSI 2018, and stored at -20 °C until use. The bacterium was prepared by obtaining the McFarland scale of 0.5. The suspension of the bacterium was spread on a petri dish with MHA (Mueller Hinton Agar) medium. After, 10 µL of colistin and polymyxin B were dispensed on the surface of the medium at concentrations of 2.0 µg / mL, 4.0 µg / mL and 8.0 µg / mL and incubated at 35 °C ± 2 °C for 18 to 24 h. The MIC was defined as the lowest concentration of antibiotic capable of inhibiting the growth of the microorganism. *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were included as control strains.

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using the computing environment R (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2018). We used the pROC and epiR packages to plot receiver-operating-characteristic (ROC) curves and to calculate the area under the ROC curve (AUC) and the concordance analysis was performed by the Cohen's kappa coefficient.

Discrimination was evaluated by the AUC, by comparing the two AUCs by DeLong's test. The non-parametric bootstrap method can be used to simulate real-world situations, as well as to validate the tests. From the data obtained from the present study, we randomly generated 10000 bootstrap samples of the same size, obtained by resampling and replacement of each sample, to validation test. Tests were 2-tailed and an alpha level of 0.05 indicated statistically significant results

### *Breakpoints and Definitions*

CLSI interpretive guidelines used for each antimicrobial tested are ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) as follows: for *P. aeruginosa*,  $\leq 2.0 \mu\text{g} / \text{mL}$  susceptible,  $4.0 \mu\text{g} / \text{mL}$  intermediate,  $\geq 8.0 \mu\text{g} / \text{mL}$  resistant (polymyxin B) and  $\leq 2.0 \mu\text{g} / \text{mL}$  susceptible,  $\geq 4.0 \mu\text{g} / \text{mL}$  resistant (colistin) and for *Acinetobacter* spp,  $\leq 2.0 \mu\text{g} / \text{mL}$  susceptible,  $\geq 4.0 \mu\text{g} / \text{mL}$  resistant (for polymyxin B and colistin). Enterobacteriaceae was evaluated for colistin and polymyxin B using the EUCAST 2018, with breakpoints: interpretation:  $\leq 2.0 \mu\text{g} / \text{mL}$  susceptible,  $>2.0 \mu\text{g} / \text{mL}$  resistant.

Very major errors were defined when determined as false susceptible, with an acceptable performance rate of 3%. Major errors were defined as a false resistant result, with an acceptable performance rate of 3% [12].

If there were no growth of the bacterium in any of the positions that were inoculated with colistin and polymyxin B gout test of  $2.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ ,  $4.0 \mu\text{g} / \text{mL}$  and  $8.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ , probably the result of colistin and polymyxin B is  $\leq 2.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ . If there is a growth of the bacterium only in the position that the gout test of colistin and / or polymyxin B of  $2.0 \mu\text{g} / \text{mL}$  was inoculated, the probable result of colistin and / or polymyxin B is  $4.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ . If bacterial growth occurs at the positions that were inoculated with colistin and / or polymyxin B at  $2.0 \mu\text{g} / \text{mL}$  and  $4.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ , the probable result is  $8.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ . If colistin and / or polymyxin B of  $2.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ ,  $4.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ , and  $8.0 \mu\text{g} / \text{mL}$  were inoculated, the likely result of colistin and / or polymyxin B is  $\geq 16.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ .

## **Results**

### **Sample**

We analyzed 521 microorganisms isolates during a series of clinical studies and 57 polymyxin resistant *K. pneumoniae*. A total of 578 bacterial strains were used in this study, including *A. baumannii* 244 (42.2%), *P. aeruginosa* 108 (18.7%), *K. pneumoniae* 214 (37%), *E. coli* 3 (0.5%) and *Enterobacter* spp 9 (1.6%).

## BMD and Vitek 2® performance

In the evaluation of broth microdilution (BMD) for all microorganisms studied, showing 420 isolates colistin sensitive and 158 colistin resistant. BMD for *K. pneumoniae* detected that 68 isolates were susceptible and 146 resistant to colistin. For polymyxin B, BMD showed 423 isolates sensitive and 155 resistant. Furthermore for *K. pneumoniae* 70 isolates showed susceptible and 144 resistant to polymyxin B. In addition, the performance of Vitek 2® automated system identified 416 isolates were susceptible and 145 colistin resistant. For only *K. pneumoniae*, 65 of these isolates were susceptible to colistin and 139 resistant, as shown in Table 1.

## Gout test performance

The results of the gout test to colistin and polymyxin B, in concentrations 2.0 µg / mL, 4.0 µg / mL and 8.0 µg / mL, are shown in Table 1.

All of the isolates studied were evaluated by gout test at colistin concentration of 2.0 µg / mL, 4.0 µg / mL and 8.0 µg / mL. The very major errors (VME) presented rates of 0.69% (2.0 µg / mL), 1.21% (4.0 µg / mL) and 0.86% (8.0 µg / mL) and for major errors (ME) 8.3% (2.0 µg / mL), 4.34% (4.0 µg / mL), 4.32% (8.0 µg / mL) (Table 1). The test performance was measured by the AUC ROC curve of 0.9302 (2 µg / mL), 0.9671 (4 µg / mL), 0.9149 (8 µg / mL), test reliability with respect to the rate 0,7916 (2.0 µg / mL), 0.9305 (4.0 µg / mL), 0.8639 (8.0 µg / mL), and the Kappa index (Table 2).

We also calculated for all the study isolates the gout test for polymyxin B in concentrations of 2.0 µg / mL, 4.0 µg / mL and 8.0 µg / mL. The VME presented a rate of 0.69% (2.0 µg / mL), 1.55% (4.0 µg / mL), and 3.63% (8.0 µg / mL), and for ME 8.98% (2.0 µg / mL), 2.07% (4.0 µg / mL), 1.03% (8.0 µg / mL) (Table 1). The test results measured by the ROC curve with AUC of 0.9422 (2.0 µg / mL), 0.9568 (4.0 µg / mL), 0.9142 (8.0 µg / mL), depending on the reliability of the avaliated gout test. Kappa index showed results of 0.8268 (2.0 µg / mL), 0.9079 (4.0 µg / mL), 0.8772 (8.0 µg / mL), as Table 2.

The results of all isolates for Vitek 2® for VME were 2,24% and for ME 0.69 (Table 1). From the ROC curve, AUC was 0.9541 with a Kappa index of 0.9049 (Table 2). *K. pneumoniae* isolates were evaluated for the 2.0 µg / mL, 4.0 µg / mL

and 8.0 µg / mL for colistin gout test, with VME rates of 0.93% (2.0 µg / mL), 2.33% (4.0 µg / mL), and 9.81% (8.0 µg / mL), and for ME 5.14% (2.0 µg / mL), 1.86% (4.0 µg / mL), and 1.07% (8.0 µg / mL). For polymyxin, gout tests showed results for VME rates of 1.40% (2.0 µg / mL), 2.80% (4.0 µg / mL), and 8.41% (8.0 µg / mL), and for ME 5.60% (2.0 µg / mL), 2.80% (4.0 µg / mL), 1.40% (8.0 µg / mL) (Table 1).

**Table 1** Performance characteristics of colistin and polymyxin B susceptibility testing methods in comparison to broth microdilution of 578 isolates BGN.

Drug	Microorganism	Method	N° of susceptible	N° of resistant	ME (%)	VME (%)	
<b>Colistin</b>	All cases (n=578)	BMD	420	158	NA	NA	
		VITEK® 2	429	149	0.69	2.24	
		Gout test					
		2.0 µg/mL	376	202	8.30	0.69	
		4.0 µg/mL	418	160	4.34	1.21	
		8.0 µg/mL	440	138	4.32	0.86	
	<i>K. pneumoniae</i> (n=214)	BMD	68	146	NA	NA	
		VITEK® 2	65	139	2.33	2.33	
		Gout test					
		2.0 µg/mL	59	155	5.14	0.93	
		4.0 µg/mL	69	145	1.86	2.33	
		8.0 µg/mL	86	127	1.07	9.81	
<b>Polymyxin B</b>	All cases (n=578)	BMD	423	155	NA	NA	
		Gout test					
		2.0 µg/mL	389	189	8.98	0.69	
		4.0 µg/mL	420	158	2.07	1.55	
	8.0 µg/mL	438	140	1.03	3.63		
	<i>K. pneumoniae</i> (n=214)	BMD	70	144	NA	NA	
		Gout test					
		2.0 µg/mL	61	153	5.6	1.40	
		4.0 µg/mL	70	144	2.80	2.80	
		8.0 µg/mL	85	129	1.40	8.41	

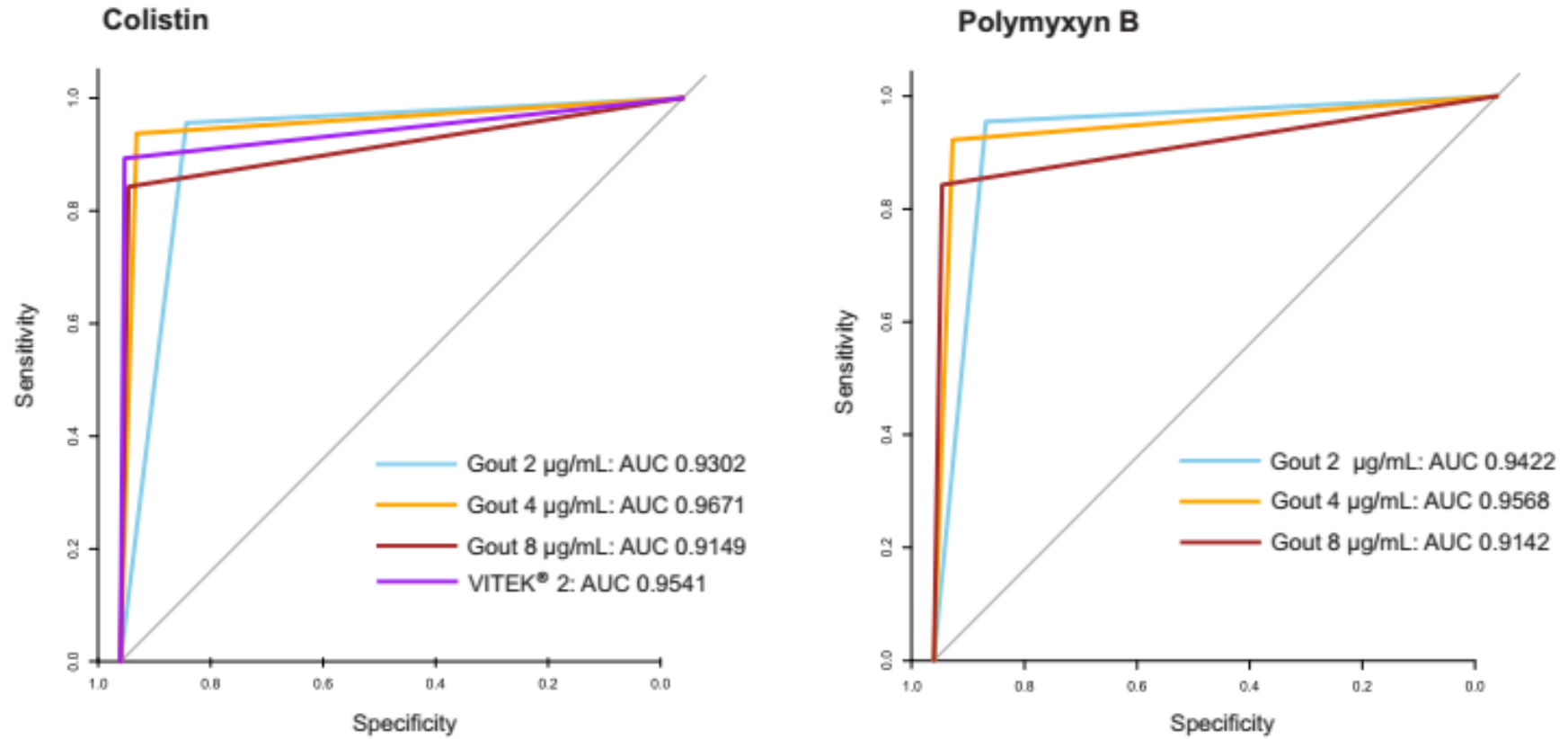
<sup>a</sup> The isolates were designated as resistant based on broth microdilution. A MIC > 2 mcg / mL was considered resistant.

Table 2 Performance characteristics of colistin and polymyxin B susceptibility testing methods in comparison to broth microdilution, of 578 isolates BGN.

Drug	Method	AUC (CI 95%)	Sensibility (CI 95%)	Specificity (CI 95%)	PPV (CI 95%)	NPV (CI 95%)	Correctly classified cases (CI 95%)	Kappa (SE)
<b>Colistin</b>	<b>Gout</b>							
	2.0 µg/mL	0.9302 (0.9106-0.9498)	0.9893 (0.9798-0.9970)	0.7623 (0.6975-0.8192)	0.8830 (0.8483-0.9122)	0.9559 (0.9113-0.9821)	0.9100 (0.8836-0.9320)	0.7916 (0.0419)
	4.0 µg/mL	0.9671 (0.9496-0.9847)	0.9832 (0.9580-0.9924)	0.9437 (0.8959-0.9735)	0.9785 (0.9597-0.9901)	0.9556 (0.9108-0.9820)	0.9723 (0.9554-0.9840)	0.9305 (0.0415)
	8.0 µg/mL	0.9149 (0.8859-0.9439)	0.9431 (0.9172-0.9628)	0.9637 (0.91740-0.9881)	0.9880 (0.9724-0.9961)	0.8417 (0.7753-0.8949)	0.9480 (0.9267-0.9647)	0.8639 (0.0414)
	<b>VITEK® 2</b>	0.9541 (0.9321-0.9761)	0.9669 (0.9487-0.9837)	0.9731 (0.9326-0.9926)	0.9904 (0.9757-0.9973)	0.9177 (0.8634-0.9554)	0.9705 (0.9533-0.9827)	0.9246 (0.0415)
<b>Polymyxin B</b>	<b>Gout</b>							
	2.0 µg/mL	0.9422 (0.9237-0.9607)	0.9897 (0.9738-0.9971)	0.7989 (0.7346-0.8536)	0.9101 (0.8787-0.9920)	0.9741 (0.9352-0.9816)	0.9273 (0.9030-0.9471)	0.8268 (0.0412)
	4.0 µg/mL	0.9568 (0.9367-0.9769)	0.9785 (0.9597-0.9900)	0.9240 (0.8710-0.9601)	0.9716 (0.9509-0.9852)	0.9225 (0.8686-0.9593)	0.9636 (0.9449-0.9737)	0.9079 (0.0415)
	8.0 µg/mL	0.9142 (0.8853-0.9432)	0.9520 (0.9276- 0.9700)	0.9532 (0.9090-0.9841)	0.9858 (0.9638-0.9947)	0.8645 (0.8038-0.9141)	0.9532 (0.9307-0.9675)	0.8772 (0.0414)

AUC: area under curve; CI: confidence interval; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; SE: standard error.

Figure 1. Receiver Operating Curves (ROC) to compare colistin and polymyxin B gout tests, Vitek 2® (colistin) with broth microdilution in colistin and polymyxin B, of 578 isolates BGN



**Table 3** DeLong test results of gout test and VITEK® 2 area under the ROC curve (AUC), of 578 isolates BGN.

Drug	Methodology	Gout 2.0 µg/mL	Gout 4.0 µg/mL	Gout 8.0 µg/mL	VITEK® 2
<b>Colistina</b>					
	Gout 2.0 µg/mL	-	p<0.0001	p=0.3228	p=0.065
	Gout 4.0 µg/mL	-	-	p<0.0001	p=0.285
	Gout 8,0 µg/mL	-	-	-	p=0.0192
	VITEK® 2	-	-	-	-
<b>Polymyxin B</b>					
	Gout 2.0 µg/mL	-	p=0.1129	p=0.1211	-
	Gout 4.0 µg/mL	-	-	p=0.0203	-
	Gout 8.0 µg/mL	-	-	-	-

## Discussion

Since the emergence of intrinsic and transferable mechanisms of resistance to polymyxin is becoming a critical issue throughout the world, the development of rapid and reliable methods for determining susceptibility and resistance to polymyxins is an urgent need of clinical laboratories [13, 14]. Thus, the European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) published in June 2016 a document calling for a rapid risk assessment to control the spread of plasmid-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae microorganisms [9]. Thus, the PAN-BR also presented a strategic plan that aims to ensure that the capacity to treat and prevent infectious diseases with safe and effective drugs is maintained and that for this it is necessary to promote research to gain knowledge of antimicrobial resistance [10]. Even CLSI and EUCAST referencing BMD as a reference method for susceptibility testing. This gold standard method is difficult to perform in routine laboratories because it requires skilled researchers, is time consuming, and requires the manual preparation of antibiotic solutions, making difficult the laboratory detection of clinical isolates with resistance to polymyxins [15].

This is the first Brazilian study that proves through statistical tests a new agar dilution method (drop test) that can be used in screening to predict resistance to polymyxins. In the analysis of the isolates together, the sensitivity and specificity tests indicate high precision, shown in Figure 1. We plotted a Receiver Operating

Characteristic (ROC) curve to examine the true positive rate (Sensitivity) versus false positive rate (Specificity), as a measure of the inherent validity of our screening test for colistin and polymyxin B. It was evident that for the colistin drop test polymyxinB at the concentration of 4.0  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , the AUC was higher than at concentrations of 2.0 and 8.0  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . In Figure 1, the isolates of *K. pneumoniae* were separated for analysis because they present a higher frequency of resistant isolates in our laboratory, where the data of VME and ME confirm that the drop of colistin and polymyxin 4.0  $\mu\text{g} / \text{mL}$  represents the best test concentration.

In order to validate the new screening test, we also analyzed the Kappa concordance index that presented values higher than the recommended definitions at all test concentrations. However, the concentration of colistin and polymyxinB of 4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  demonstrated a better agreement, which proved to be a methodology with good performance, and is therefore reliable in clinical laboratories.

In our study, the Vitek 2<sup>®</sup> system also presented relevant statistical results when analyzed with all 578 BGN isolates. The AUC value indicates high sensitivity and specificity of the system and with VME values below the acceptable limit. The Kappa concordance coefficient presented good accuracy, affirming that it is a safe methodology for screening the detection of colistin susceptibility. However, previous studies have shown that the colistin test of Enterobacteriaceae isolates performed by the Vitek 2<sup>®</sup> system had a high VME rate (36%)[16]. In addition, in a study of 361 BGN isolates, 2.2% of (ME) and 6.3% of VME were observed. Vitek 2<sup>®</sup> automated system showed a variable performance among BGN species for detecting susceptibility to colistin [17].

The limitations of our study occurred with some microorganisms in which the instance of BGN isolates showing resistance to polymyxins is not frequent. Thus the VME and ME results remained outside the desired limits for a good test performance, this is probably due to the low degree of freedom of these isolates.

Although all tests that are recommended to validate a methodology showed excellent results such as the AUC and the Kappa concordance index. The DeLong test was performed in our study in order to strengthen the validation data. The test indicated statistically significant results for the gout test mainly for the 4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gout tests (Table 3).

## Conclusion

Our findings suggest that gout testing may be proposed as a screening method for the detection of polymyxin-resistant microorganisms. We observed that the concentration of the colistin gout test and polymyxin B of 4.0 µg / mL had similarly higher results than the Vitek 2<sup>®</sup> system, and can be used with confidence in the practice of clinical laboratories. This study emphasizes that the gout test is an alternative simple phenotypic method of screening, and is an easy-to-interpret and cost-effective technique which can be easily implemented in clinical microbiological practice to detect resistance to polymyxins. In summary, we emphasize the need for the implementation of easy and inexpensive tests, in clinical microbiology laboratory routine, in order to detect and contain the spread of polymyxin-resistant microorganisms.

## References

1. Vincent J, Rello J, Marshall J. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA*. 2009;302:2323. doi:10.1001/jama.2009.1754.
2. Wright H, Bonomo RA, Paterson DL. New agents for the treatment of infections with Gram-negative bacteria: restoring the miracle or false dawn? *Clin Microbiol Infect*. 2017;23:704–12. doi:10.1016/j.cmi.2017.09.001.
3. Shin B, Park W. Antibiotic resistance of pathogenic *Acinetobacter* species and emerging combination therapy. *J Microbiol*. 2017;55:837–49.
4. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 2013;13:785–96.
5. Richter SS, Mason P, van Duin D, Jacobs MR, Fowler VG, Fox J, et al. Surveillance of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Tracking Molecular Epidemiology and Outcomes through a Regional Network. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:4035–41.
6. Scheld M, Talbot GH, Gilbert D, Edwards JE, Bradley JS, Boucher HW, et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2008;48:1–12.
7. Thornsberry C, Draghi DC, Karlowsky JA, Jones ME, Sahm DF, Friedland IR. Surveillance for Antimicrobial Susceptibility among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from Hospitalized Patients in the United States, 1998 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:1681–8.
8. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16:161–8. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
9. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Plasmid-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae Improved laboratory methods for colistin resistance and. 2016; June.
10. Brasil. Ministério da saúde Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única 2018-2022. Brasília, Brasil:

Ministério da Saúde; 2018.

11. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100. Wayne PA. Perform Stand Antimicrob susceptibility testing CLSI Suppl M100 Wayne PA. 2017;:282.
12. Simar S, Sibley D, Ashcraft D, Pankey G. Colistin and Polymyxin B Minimal Inhibitory Concentrations Determined by Etest Found Unreliable for Gram-Negative Bacilli. *Ochsner J*. 2017;17:239–42. doi:10.1043/1524-5012-17.3.239.
13. Caspar Y, Maillat M, Pavese P, Francony G, Brion J, Mallaret M, et al. Colistin Resistance in ESBL-Producing. *Emerg Infect Dis*. 2017;23:874–6.
14. Donà V, Bernasconi OJ, Kasraian S, Tinguely R, Endimiani A. A SYBR® Green-based real-time PCR method for improved detection of *mcr-1*-mediated colistin resistance in human stool samples. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017;9:57–60. doi:10.1016/j.jgar.2017.01.007.
15. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin Infect Dis*. 2009;49:1749–55.
16. Chew KL, La M-V, Lin RTP, Teo JWP. Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for Carbapenem-Resistant and *mcr*-Positive Enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with Broth Microdilution. *J Clin Microbiol*. 2017;55:2573–82. doi:10.1128/JCM.00888-17.
17. Girardello R, Cury AP, Renata M, Franco G, Romano T, Gióia D, et al. Colistin susceptibility testing and Vitek-2™: is it really useless? 2018;1–5. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2018.03.019.

## ARTIGO 2 - Epidemiological study of carbapenem and polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae* at the University Hospital of Londrina

### Abstract

**Background.** *Klebsiella pneumoniae* is a causative agent of community and hospital infection, and it has a high capacity to acquire mechanisms of resistance, including carbapenemase, thus the treatment has been restricted to the use of polymyxins.

**Methods.** *K.pneumoniae* carbapenem and polymyxin resistant isolates (n= 57) were included in this study. We analyzed the phenotypic tests of broth microdilution, and automated system Vitek 2<sup>®</sup>. Using PCR, we investigated the genes extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) of the cefotaxime type (CTX-M), carbapenemase of type KPC, VIM, NDM, OXA-48 and the *mcr-1*. Genetic variability analysis was performed by the Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR). The epidemiological data were obtained through the analysis of medical records and laboratory tests.

**Results.** The resistance of the 57 isolates was classified as PDR (38.6%) and XDR (61.4%) based on the phenotypic tests of VITEK<sup>®</sup> 2 (bioMérieux) and broth microdilution. An analysis of genetic variability identified the absence of clonal species. All samples carried the gene *bla*KPC<sub>2</sub> (100%), while no strain was positive for the gene *mcr-1*. Several associations with found group of ESBL *bla*<sub>CTX-M</sub> were found: CTX-M-1 (22,8%), CTX-M-15 (21,1%), CTX-M-2 (10,5%), CTX-M-8 (31,6%), CTX-M-9 (56,1%) and CTX-M-25 (no detected). The isolates shown no genetic correlation. Based on the analysis of medical records and laboratory tests, we observed that predominantly the isolates were from samples of urine (52,6%), followed by tracheal secretion (17,5%), blood (15,8), tissue (8,8%), peritoneal fluid (3,5%) and sacral ulcer, (1,8%). We identified that (42.1%) the patients were hospitalized in the intensive care unit with the advent of infection. Regarding the previous use of antibiotic therapy, we found that (77.2%) used antibiotics and of these (47.4%) they used polymyxins. We also evaluated Charlson's comorbidity index to predict hospital death risk in hospitalizations and (59.8%) obtained superior data (Charlson > 2) classified as severe. Of the 57 patients in the study, (56.1%), they died. In summary, this study provides additional information on epidemiological data on polymyxin-resistant *K. pneumoniae*.

**Key-words:** *Klebsiella pneumoniae*, resistance, polymyxins, *mcr*

## Introduction

Antibiotic resistance is a growing crisis and a grave threat to human health. It is projected that antibiotic-resistant infections will lead to 10 million annual deaths worldwide by the year 2050. Among the most significant threats are carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, including carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (BAND et al., 2018). In this context the use of polymyxin re-emerged, mainly for infections caused by multidrug resistant Gram-negative bacteria (BARON et al., 2016).

After, polymyxin and colistin, being mostly abandoned in the 1970s, these cationic antimicrobial peptides have reemerged as a “last-line” therapeutic option for several multidrug-resistant microorganisms. In severe carbapenem-resistant *K. pneumoniae* infections, colistin is often used in combination with other antibiotics including tigecycline, meropenem, gentamicin or fosfomycin (ROJAS et al., 2017). However unfortunately, the increased and inappropriate use of colistin has led inexorably to the worldwide emergence of colistin-resistant bacteria (BARON et al., 2016), probably with the rise in consumption of colistin, cases of colistin-resistant *K. pneumoniae* carbapenemase (KpRCP) producing strains are reported globally (ROJAS et al., 2017).

Polymyxin resistance in Gram-negative bacteria is primarily due to post-translational modification of the lipopolysaccharide (LPS) molecules that form the outer layer of the outer membrane. In most resistant strains, substituents such as 4-amino-4-desoxy-l-arabinose (l-Ara4N), phosphoethanolamine (pEtN) or galactosamine are enzymatically added to the lipid A or the core(AH; KIM; LEE, 2014; ESPOSITO et al., 2017; JEANNOT; BOLAR; PLÉSIAT, 2017).

Acquisition of polymyxin resistance in *K. pneumoniae* (KpRCP) results from the addition of l-Ara4N and/or pEtN to the lipid A. The *arnBCADTEF* operon (also called *pmrHFIJKLM* or *pbgPE*) and the *pmrC* gene that promote these modifications, respectively, are under positive control of the TCSs PhoPQ and PmrAB. Single point mutations in both TCSs have been held responsible for polymyxin resistance in *K. pneumoniae*. More evidence has accumulated on the role played by *mgrB*, a gene encoding a small regulatory transmembrane protein, *mgrB*, that negatively regulates the kinase activity of PhoQ and whose inactivation increases polymyxin resistance. Whatever the genetic events leading to *mgrB* inactivation, a phosphorylation cascade involving PhoQ, PhoP, PmrD and/or PmrAB is activated that finally triggers

expression of the operon *arnBCADTEF* and LPS modification. Alteration of the *mgrB* gene by insertion sequences (IS5-like, IS1F, ISKpn13, ISKpn14, IS10R), point mutations or indels thus represents the most common cause of polymyxin resistance in clinical *K. pneumoniae* strains (AH; KIM; LEE, 2014; BARON et al., 2016; ESPOSITO et al., 2017; FALAGAS; RAFAILIDIS; MATTHAIYOU, 2010; JEANNOT et al., 2017; OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014; SRINIVAS; RIVARD, 2017).

Until now, polymyxin resistance was always linked to a chromosomal mechanism, but a new mechanism of resistance completely changed that view in November 2015, Liu et al. described for the first time the emergence of colistin resistance in *E. coli* acquired in the Chinese community in animals and humans attributed to a plasmid-mediated *mcr-1* gene (LIU et al., 2016). This gene encodes a phosphoethanolamine transferase that catalyzes the addition of a PEtN to lipid A, leading to a decrease in the affinity of colistin for LPS (AURÉLIE et al., 2018; ESPOSITO et al.; 2017; GIAMARELLOU, 2016).

The *mcr* gene has been shown to disseminate ubiquitously, suggesting that the use of colistin probably accelerated the spread of resistance in animals and humans, generating concern in the clinical setting due to the lack of alternatives for treatment. Therefore, there is a need for rapid and reliable methods for polymyxin sensitivity testing (AURÉLIE et al., 2018).

In this context, the aim of this study was characterize epidemiological and molecular the clinical isolates of carbapenem and polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae* at the University Hospital of Londrina.

## **Materials and Methods**

**Bacterial Isolates.** In the studied period, 132 KpRCP strains were detected in patients at the hospital. One isolate per patient was included in this study, resulting in 57 samples from different patients admitted to the Hospital University of Londrina from 2016 to 2017, according to criteria Centers for Disease Control and Prevention (CDC)(CDC, 2019).

**Collected Data.** Demographic data were collected from all patients, including age, gender and comorbidities of medical records provided for consultation by the Medical Archive and Statistics Service (SAME) of the University Hospital of Londrina. The

study was approved by the Ethics and Research Committee of the State University of Londrina CAAE 43013315.8.0000.5231.

*Antimicrobial susceptibility.* For the identification of the isolates, the VITEK® 2 GN ID card and the VITEK® 2 AST 239 card were used for antibiogram. All cards are from bioMérieux, USA. Interpretation was performed according to the CLSI 2017 (Clinical and Laboratory Standards Institute) criteria.

*Minimum inhibitory concentration (MIC).* The MIC was determined by broth microdilution (BMD). The bacterial suspensions were adjusted according to CLSI recommendations. *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *E. coli* ATCC 25922 were used for quality control to broth microdilution test, as described in CLSI for meropenem and imipenem. For polymyxins (colistin and polymyxin B), the bacteria used were *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *E. coli* ATCC 25922. The microplates were incubated at  $37 \pm 2$  °C for 21 to 24 hours and visually evaluated. The MIC is defined as the lowest concentration of antibiotic capable of inhibiting the growth of the microorganism.

*Characterization de carbapenemase .* Detection of the *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e genes was performed by multiplex PCR, as described by Monteiro et al. (2012) .

*Characterization de CTX-M.* Detection of the *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>MCR-1</sub> *bla*<sub>CTXM</sub> genes were performed by multiplex PCR, as described by Leflon-Guibout et al., (2004); Woodford; Fagan; Ellington, (2006).

*Characterization gene mcr-1.* Genes were performed by multiplex PCR, as described Liu et al. (2016).

*Analysis of genetic variability.* Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) was performed as previously described by Versalovic et al. (1991).

*Statistical analysis.* Categorical data were shown by frequency and percentage. The analysis was performed by Chi-square test or Fischer's exact test, when necessary. The alpha significance level was 0.05. Data analysis was performed using Statistical

Package for Social Sciences (SPSS - IBM Corp., New York, USA), version 20 for Windows.

## Results

### Automated system Vitek 2<sup>®</sup>

For the 57 strains of the present study, Vitek 2<sup>®</sup> presented the following resistance profile for colistin (98.2%), meropenem (98.2%), imipenem (98.2%), ertapenem (98.2%), ceftazidime (98.2%), cefepime (98.2%), ciprofloxacin (92.9%), sulfamethoxazole trimethoprim (94.7%), piperacillin tazobactam (89.5%), , tigecycline (94.7%), gentamicin (77.2%) and amikacin (52.6) (Figure 1).

### *Broth microdilution*

For the carbapenems imipenem, meropenem and ertapenem and for polymyxins all the tests had MIC above of the breakpoints considered sensitive (Figure1).

### *β-lactamases*

Of the 57 strains of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems and polymyxins, all samples contained the *bla*KPC-2 gene (100%), whereas in no sample the VIM, NDM and OXA-48 genes were detected. For CTX-M (87.8%), they had one or more type of ESBL of the CTX-M these for CTX-M-1 (22,8%), CTX-M-15 (21,1%), CTX-M-2 (10,5%), CTX-M-8 (31,6%), CTX-M-9 (56,1%) and CTX-M-25 (without positive sample), respectively (Figure 1).

Dendrogram

Susceptibility Profile Vitek 2®

Microdilution in broth

Molecular characteristics

80%

AK	GN	CP	SXT	PTZ	CAZ	CTX	FEP	ERT	IMP	MER	TIG	COL	Resistance rating	Origin	Sector	Gender	Age	Death	Imipenem mcg/MI	Meropenem mcg/MI	Colistin mcg/MI	Pevymyxin mcg/MI	Resistance genes																																	
																								116	6	47	32	101	100	59	85	44	132	130	128	126	119	42	109	103	117	84	51	106	13	3	120	104	99	107	54	96	46	41	2	80
													PDR	U	FW	M	61	N	16	8	32	64	KPC-2, CTX-M-1, CTX-M-15																																	
													PDR	U	ICU	F	54	Y	≥128	≥128	≥128	64	KPC-2, CTX-M-9																																	
													PDR	U	FW	F	67	N	16	32	16	32	KPC-2																																	
													XDR	U	FW	F	74	N	16	64	8	8	KPC-2, CTX-M-1, CTX-M-15																																	
													PDR	ST	ICB	M	31	Y	64	32	64	32	KPC-2, CTX-M-9																																	
													XDR	BD	FW	F	78	Y	64	64	64	32	KPC-2																																	
													XDR	U	ICB	F	63	N	32	32	16	4	KPC-2, CTX-M-8, CTX-M-9																																	
													PDR	BD	ICB	F	63	Y	≥128	64	64	16	KPC-2, CTX-M-8, CTX-M-9																																	
													XDR	U	ICU	M	71	N	32	64	32	32	KPC-2, CTX-M-9																																	
													XDR	U	EW	F	39	N	64	64	16	16	KPC-2, CTX-M-9																																	
													PDR	U	A	F	50	N	8	64	32	32	KPC-2, CTX-M-9																																	
													XDR	U	ICU	M	84	Y	32	8	16	16	KPC-2, CTX-M-1, CTX-M-15																																	
													PDR	BD	ICB	F	22	N	8	8	32	64	KPC-2, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9																																	
													XDR	U	ICB	F	92	Y	64	16	32	16	KPC-2																																	
													PDR	U	ICU	M	72	N	64	32	64	32	KPC-2, CTX-M-8, CTX-M-9																																	
													PDR	U	ICU	F	59	Y	64	≥128	64	64	KPC-2																																	
													XDR	U	MW	M	84	Y	4	8	≥128	≥128	KPC-2																																	
													PDR	T	ICB	M	18	N	64	16	32	64	KPC-2, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9																																	
													XDR	U	MAT	F	37	N	32	4	64	64	KPC-2, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9																																	
													XDR	U	ICU	F	58	Y	32	64	32	32	KPC-2, CTX-M-9																																	
													XDR	BD	ICU	F	60	Y	64	64	64	32	KPC-2, CTX-M-1, CTX-M-15																																	
													XDR	BD	ICU	M	65	Y	≥128	≥128	16	64	KPC-2																																	
													PDR	U	FW	F	44	N	64	64	16	8	KPC-2, CTX-M-9																																	
													XDR	BD	MW	M	42	N	32	16	8	8	KPC-2, CTX-M-1, CTX-M-15																																	
													XDR	LP	ICU	M	63	Y	≥128	≥128	64	32	KPC-2																																	
													XDR	US	FW	F	80	N	≥128	≥128	64	32	KPC-2, CTX-M-9																																	
													PDR	T	FW	F	74	Y	8	64	64	16	KPC-2, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9																																	
													XDR	U	ICB	M	47	N	16	64	64	64	KPC-2, CTX-M-8																																	
													PDR	BD	ICU	M	59	Y	8	32	32	32	KPC-2, CTX-M-1																																	
													XDR	U	ICU	F	42	Y	64	≥128	8	4	KPC-2, CTX-M-1, CTX-M-15																																	
													PDR	U	ICB	M	39	Y	64	64	64	32	KPC-2, CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-8, CTX-M-9																																	
													XDR	U	ICU	M	53	Y	≥128	16	32	32	KPC-2																																	
													XDR	ST	MW	M	65	Y	≥128	64	4	4	KPC-2, CTX-M-9																																	
													XDR	U	PS	M	26	N	8	4	16	16	KPC-2, CTX-M-9																																	
													PDR	T	ICB	M	42	Y	64	64	16	8	KPC-2, CTX-M-9																																	
													XDR	ST	MW	M	65	Y	32	16	4	8	KPC-2, CTX-M-8, CTX-M-9																																	
													XDR	U	FW	F	53	N	64	≥128	64	32	KPC-2, CTX-M-9																																	
													PDR	T	PS	M	22	N	64	64	64	64	KPC-2, CTX-M-8																																	
													XDR	U	ICU	M	69	Y	64	≥128	8	8	KPC-2, CTX-M-8																																	
													XDR	ST	PS	M	50	N	4	8	64	32	KPC-2, CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-9																																	
													XDR	T	MW	M	69	Y	64	64	64	64	KPC-2, CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-9																																	
													XDR	LP	MW	M	70	N	32	≥128	4	64	KPC-2																																	
													XDR	U	FW	F	53	Y	16	8	64	32	KPC-2, CTX-M-1, CTX-M-15																																	
													XDR	U	MW	M	67	Y	4	16	64	≥128	KPC-2, CTX-M-9																																	
													PDR	BD	ICB	M	51	N	32	32	32	32	KPC-2, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9																																	
													XDR	U	MW	M	48	N	4	4	32	4	KPC-2, CTX-M-9																																	
													PDR	ST	FW	F	42	Y	64	32	16	16	KPC-2, CTX-M-9																																	
													XDR	BD	MW	M	75	Y	≥128	64	64	32	KPC-2, CTX-M-9																																	
													XDR	ST	MW	M	49	Y	64	64	32	8	KPC-2, CTX-M-8																																	
													XDR	U	ICU	F	82	Y	32	≥128	16	8	KPC-2, CTX-M-8																																	
													PDR	ST	MW	M	55	N	≥128	≥128	4	4	KPC-2, CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-8, CTX-M-9																																	
													XDR	ST	ICU	M	82	Y	16	≥128	64	16	KPC-2, CTX-M-9																																	
													PDR	U	ICU	F	62	Y	64	16	4	16	KPC-2, CTX-M-9																																	
													XDR	ST	MW	M	32	N	≥128	≥128	4	4	KPC-2, CTX-M-9																																	
													XDR	ST	MW	M	45	Y	≥128	≥128	32	16	KPC-2, CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-8																																	
													PDR	U	PD	F	13	N	8	32	8	64	KPC-2, CTX-M-1, CTX-M-15																																	
													PDR	U	mw	M	85	Y	64	≥128	4	4	KPC-2, CTX-M-8, CTX-M-9																																	

Figure 1. Dendrogram of clustering of 57 *K. pneumoniae* isolates and determinants and antimicrobial resistance profile. Amikacin (AK), gentamicin (GN), ciprofloxacin (CIP), sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT), piperacillin-tazobactam (PTZ), ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX), cefepime (FEP),ertapenem (ERT), imipenem (IMP), meropenem (MEM), tigecycline (TIG), colistin (COL), polymyxin (POL). Origin:Blood (BD), Peritoneal fluid (LP), Sacral ulcer (US), Tissue (T), Tracheal secretion (ST), Urine (U). Sector: Ambulatory (A), Emergency room (ER), Female ward (FW), Intensive care unit (ICU), Intensive Care Unit burned (ICB), Maleward (MW), Maternity (MAT), Pediatrics (PED).

### *Plasmidial of Polymyxins: mcr-1*

In our study there was no strain containing plasmidial polymyxin resistance to the *mcr-1* gene.

### *Genetic correlation between strains of K. pneumonia*

Genetic variability analysis using the ERIC-PCR technique did not demonstrate the presence of clonal lineages, indicating a variety of polymyxin resistant strains of *K. pneumoniae* at the University Hospital of Londrina during our study (Figure 1).

### *Demographic and clinical characteristics*

The median age of the 57 patients was 59 years (range 13 - 79 years) and 56.1% were male. In this study, the most prevalent comorbidity was great burn (26.3%), followed by cerebrovascular disease (15.7%), post surgery (15.7%), lung disease (8.8), polytrauma (5.26%), myocardial infarction, appendicitis, immunologic disease, renal failure, solid tumor, H1N1 (3.6%), and HIV, cholecystitis, digestive hemorrhage, hydrocephalus normal pressure, with (1.7%) each. According to data from medical records and laboratory, 30 (52.6%) patients had from urinary origin, 10 (17.5%) tracheal secretion, 9 (15.8%) blood, 5 (8.8%), tissue, 2 (3.5%) peritoneal fluid, 1 (1.8%) sacral ulcer. Regarding the previous use of antibiotic therapy we found that (77.2%) previously used antibiotics and of these (47.4%) they used polymyxins, followed by carbapenems and piperacilin tazobactam (35.1%), tigecycline (24.6%), aminoglycoside and sulfamethoxazole trimethoprim (12.3%), quinolone (8.8%), cephalosporin third generation (7.0%) and finally cephalosporin fourth generation (1.7%). Of the 57 patients studied, more than half (56.1%) died (Table 1).

**Table 1** Baseline characteristics of patients, infectious processes and antimicrobial treatments.**CHARACTERISTICS (n= 57)**

	Age (years), median (range)	59 (13-92)	<b>Infection origin, n (%)</b>	
	Male gender, n (%)	32 (56.1)		Urine 30 (52.6)
<b>Charlson Comorbidity index</b>				Tracheal secretion 10 (17.5)
	Mean (SD)	3.3 (2.5)		Blood 9 (15.8)
	Median (range)	3 (0-10)		Tissue 5 (8.8)
<b>Comorbidity groups (Charlson index), n (%)</b>				Peritoneal fluid 2 (3.5)
	Low (0–1)	16 (28.0)		Sacral ulcer 1 (1.7)
	Medium (2)	7 (12.2)	<b>Invasive Procedures</b>	
	High (>2)	34 (59.8)		Central Venous Catheter 17 (29.8)
<b>Comorbidities, n (%)</b>				Mechanical ventilation 24 (42.1)
	Great Burn	15 (26.3)		Hemodialysis 14 (24.6)
	Cerebrovascular disease	9 (15.7)		Sonda Vesical de Demora 16 (28.1)
	Post Surgery	9 (15.7)		Cirurgia 21 (36.8)
	Lung disease	7 (12.3)	<b>Previous use of antibiotics</b>	
	Acute abdomen	4(7.0)		Polymixins 27 (47.4)
	Polytrauma	3(5.2)		Carbapenems 20 (35.1)
	Myocardial infarction	2 (3.6)		Piperacillin Tazobactam 20 (35.1)
	Immunologic disease	2 (3.6)		Tigecycline 14 (24.6)
	Renal failure	2 (3.6)		Aminoglycoside 7 (12.3)
	Solid Tumor	2 (3.6)		Sulfamethoxazole Trimethoprim 7 (12.3)
	HIV	1 (1.7)		Quinolone 5 (8.8)
	Hydrocephalus normal pressure	1 (1.7)		Cephalosporin third generation 4 (7.0)
				Cephalosporin fourth generation 1(1.7)
			<b>Deaths, n (%)</b>	
				Total 32 (56.1)

## Discussion

In recent years resistance to antimicrobials in microorganisms is a global health problem, seen as a threat to public health, predicted to attack 10 million deaths worldwide by the year 2050 (BAND et al.,2018; JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017). Among the most significant problems of antimicrobial resistance are carbapenem-resistant enterobacteria (CRE), including *K. pneumoniae*, which lead to high rates of morbidity and mortality (AH; KIM; LEE, 2014).

*K. pneumoniae* is an opportunistic pathogen and one of the most clinically relevant species in immunocompromised individuals, responsible for hospital-acquired and community-acquired infections *K. pneumoniae* is the causative agent of a variety of diseases including pneumonia, urinary tract infections, soft tissue, bacteremia, liver abscesses and sepsis (LEE et al., 2017). In the present study we analyzed 57 strains of KpRCP, 30 (52.6%) patients had from urinary origin, followed by 10 (17.5%) tracheal secretion, 9 (15.8%) blood, 5 (8.8%) tissue, 2 (3.5%) peritoneal fluid, 1 (1.7%) sacral ulcer (Table 1). Demonstrating the similarity between biological materials isolated by KpRCP, Rojas et al.( 2017) reported in their study that sources of positive cultures for KPRP were isolated (59%) from urine, (18%) blood, (11%) respiratory system, (5%) tissue, and (7%) from others. According to the clinical samples of the Parisi et al. (2015), 12 out of 32 strains of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems and polymyxins were isolated from urine cultures 7 strains were detected in bronchial aspirate , 6 of skin smears, 2 of blood culture , 2 in the drainage fluid, 2 strains of vaginal swabs and 1of pharyngeal swab.

With the emergence of ESBLs, carbapenem antimicrobials have been used more frequently for the treatment of these infections, but due to the selective pressure created by the use of carbapenems, increasing rates of resistance to these drugs have been observed in a variety of microorganisms, including *K. pneumoniae* that is constantly increasing in clinical settings (BARAN; NERIMAN, 2016; ESPOSITO et al., 2017; YOUSFI et al., 2018). In our study, the characterization of carbapenemase resulted predominantly the *blaKPC-2* gene (100%), but the VIM, NDM and OXA-48 genes of the isolates from our study were not detected. (Figure 1). KPC strains have spread worldwide due to the rapid spread of host-wide conjugative plasmids. Eleven variants of KPC (KPC-2 to KPC-12) have been identified, and of which KPC-2 is the most frequent (HENNEQUIN; ROBIN, 2016). Diverging in part

from the results of Rojas et al. (2017) who surveyed 246 KpRCP strains from hospitalized patients in the Great Lakes region of the United States where the results showed that the *blaKPC-2* and *blaKPC-3* genes were the most common, found in (46%) and (50%) of the KPRP isolates, respectively. According to the study by Bradford et al. (2016), 55 isolates of *K. pneumoniae* were collected from 16 countries in several geographic regions which detected four isolates of *K. pneumoniae* bearing MBL genes, including VIM-1, NDM-1 and IMP -8, isolated from Europe, Africa and Asia. Fourteen isolates of *K. pneumoniae* resistant to colistin with OXA-48-like enzymes (12 isolates containing OXA-48 and 2 isolates bearing OXA-244) were detected. These were distributed among five countries, five isolates were collected from Turkey and five additional isolates were from Romania.

In an era of increasing rates of (MDR) in conjunction with a limited number of new drugs, use of polymyxins is seen as a substantial resurgence of treatment of infections caused by Gram-negative bacteria, being considered as the last treatment for carbapenem resistant bacteria (BARON et al., 2016; JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017; GIAMARELLOU, 2018; KINOSHITA et al., 2018).

Available evidence suggests that the expanded and inadequate use of polymyxins in clinical practice has led inexorably to the worldwide emergence of polymyxin-resistant bacteria, leaving physicians unprepared to treat pan-drug resistant patients (PDR) (BARON et al., 2016; SRINIVAS; RIVARD, 2017; GIAMARELLOU, 2018). In the current study laboratory data showed that the resistance of the 57 isolates were classified as resistant to (PDR) (38.6%) and extensively resistant (XDR) (61.4%), all strains were resistant to carbapenems and polymyxins. Although the automated system Vitek 2<sup>®</sup> reported false-sensitive results for carbapenems and colistin, these results were confronted with broth microdilution reference standard. Vitek 2<sup>®</sup> erroneously reported meropenem and imipenem with MIC<sub>≤</sub>1,0 mcg/mL and for colistin MIC de 2,0 mcg/mL, while in broth microdilution the MIC of meropenem and imipenem were ≥ 64 mcg/mL and for colistin MIC<sub>≥</sub> 16 mcg/mL. In another study conducted by Bulik et al. (2010) of the 46 *K. pneumoniae* producing KPC were falsely sensitive by the automated system Vitek 2<sup>®</sup>. However, Rechenchoski et al. (2017) showed that the susceptibility to meropenem by the Vitek 2<sup>®</sup> automated system was similar in the 40 *Enterobacter* spp. Therefore, no false susceptibility was observed related to the automated method. The false sensitivity

detection rate should be less than 1.5% of the isolates as recommended in CLSI document M23-A2.

Until now, polymyxin resistance was always linked to a chromosomal mechanism, but a new resistance mechanism completely changed that view in November 2015, Liu et al. described for the first time the emergence of colistin resistance in *E. coli* acquired in the Chinese community in animals and humans attributed to a plasmid-mediated *mcr-1* gene (LIU et al., 2016). In our study, we did not detect any presence of the *mcr-1* gene. The *mcr* gene has been shown to disseminate ubiquitously, suggesting that the use of colistin probably accelerated the spread of resistance in animals and humans, generating concern in the clinical setting (AURÉLIE et al., 2018).

In the analysis of the medical records of the patients in the present study, we collected data on previous use of antibiotic therapy, and found that (47.4%) used polymyxins for treatment, followed by carbapenems and piperacillin tazobactam (35.1%), tigecycline (24.6), aminoglycoside and trimethoprim sulfamethoxazole (12.3%), quinolone (8.8%), third generation cephalosporin (7.0%) and finally fourth generation cephalosporin (1.8%) (Table 1). Data collected in the study by Rojas et al., (2017) show that in a total of 6/27 (22%) of the patients were previously exposed to colistin at any time before the first positive culture for KpRCP.

Regarding molecular typing the analysis of genetic variability identified the absence of clonal species among the isolates, indicating diversity in the hospital where the research was conducted. A study by Cabral et al. (2012) also revealed great diversity among strains of *K. pneumoniae* from two hospitals in Recife, Brazil.

In Enterobacteriaceae, the dramatic increase in third-generation cephalosporin resistance rates results mainly from the spread of ESBL, especially those belonging to the CTX-M family. The third generation cephalosporin resistance rates in Enterobacteriaceae are now consistently above 10% and may reach 70% in certain configurations Blair et al. (2014). Of observed that 57 KPRP strains present 87.8%, carried CTX-M type ESBL (Figure 1). Lower rates of ESBL were found in the work of Flores et al. (2016), which detected CTX-M in 58.8% of clinical isolates of *K. pneumoniae* from a hospital in Rio de Janeiro.

We also evaluated Charlson's comorbidity index to predict risk risk of death in hospitalizations and (59.8%), patients had high comorbidity (Charlson > 2), (2.2%) had mean comorbidity and (Charlson 2) and (28.0%) with low risk of comorbidity

(Charlson 0-1). A study with patients who had infections with polymyxin-resistant Enterobacteria shows that the Charlson comorbidity index was that (41.7%) of their population had high comorbidity (Charlson > 2), (17.6%) had average comorbidity and (Charlson 2) and (40.7%) with low risk of comorbidity (Charlson 0-1) (Table 1) (PRIM et al., 2017).

## Conclusion

An understanding of epidemiology over time is critical to the implementation of the appropriate use of antimicrobials to overcome or prevent resistance. The main contribution of this study was the dissemination of epidemiological data on the presence of KPRP, carrying genes responsible for the production of  $\beta$ -lactamases during monitoring, a still limited approach in the Brazilian health services. Resistance research within a health agency is a recommended strategy, mainly aimed at avoiding the spread of resistance genes in hospital settings and, consequently, reducing mortality. The data generated in this study indicate the importance of adopting continuous prevention measures to control the dissemination of multiresistant microorganisms. Measures such as active surveillance, rational antimicrobial use, isolation precautions, hand hygiene, and education to health personnel are critical to the success of infection control prevention programs.

## References

- AH, Y.; KIM, A.; LEE, J. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 1, p. 8–15, 2014.
- AURÉLIE, J. et al. Comparison of methods for detection of plasmid-mediated and chromosomally-encoded colistin resistance in Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology and Infection**, p. 175-179, 2018.
- BAND, V. I. et al. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumonia* Exhibiting Clinically Undetected Colistin Heteroresistance Leads to Treatment Failure in a Murine Model of Infection. **American Society for Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 1–6, 2018.
- BARAN, I; NERIMAN, A. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level reference hospital in Turkey. **Clinical Microbiology and Antimicrobials**, p. 3-11, 2016.
- BARON, S. et al. Molecular mechanisms of polymyxin resistance : knowns and unknowns. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p. 583–591, 2016.

BLAIR, J. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2014.

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, 2004.

BULIK, C. et al. Comparison of Meropenem MICs and Susceptibilities for Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates by Various Testing Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 7, p. 2402–2406, 2010.

CABRAL, A. B. et al. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 572–578, 2012.

Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance Definitions for Specific Types of Infections, 2019. Disponível em:

<[https://www.cdc.gov/nhsn/PDFs/pscManual/2PSC\\_IdentifyingHAIs\\_NHSNcurrent.pdf](https://www.cdc.gov/nhsn/PDFs/pscManual/2PSC_IdentifyingHAIs_NHSNcurrent.pdf)>  
Acesso em março 2019.

ESPOSITO, F. et al. Detection of Colistin- Resistant MCR-1 Positive *Escherichia coli* Using Inhibition by EDTA and Zeta Potential Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 3454–3465, 2017.

FALAGAS, M. E.; RAFAILIDIS, P. I.; MATTHAIIOU, D. K. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 4–5, p. 132–138, 2010.

FLORES, C. et al. Detection of antimicrobial resistance genes in beta- pneumoniae by patient surveillance cultures at an intensive care unit in Rio de Janeiro , Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 52, p. 284–292, 2016.

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

HAN, J. H. et al. Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in a Network of Long-Term Acute Care Hospitals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, p. 839–844, 2017.

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

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

KINOSHITA, Y. et al. Study of the structure-activity relationship of polymyxin analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, p. 2–5, 2018.

LEE, C. et al. Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* : Epidemiology , Determinants , and Resistance Mechanisms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 1-13, 2017.

LEFLON-GUIBOUT, V. et al. Emergence and spread, of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3736–3742, 2004.

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 p. 161-168, 2016.

MONTEIRO, J. et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 906–909, 2012.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.

PARISI, S. G. et al. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* strains producing carbapenemases and increase of resistance to colistin in an Italian teaching hospital from January 2012 To December 2014. **BMC Infectious Diseases**, p. 1–10, 2015.

PRIM, N. et al. Prevalence of colistin resistance in clinical isolates of Enterobacteriaceae : A four-year cross-sectional study. **Journal of Infection**, p. 493–498, 2017.

RECHENCHOSKI, D. et al. Antimicrobial activity evaluation and comparison of methods of susceptibility for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase ( KPC ) -producing Enterobacter spp . isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 509–514, 2017.

ROJAS, L. J. et al. Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* : Laboratory Detection and Impact on Mortality. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, p. 711–718, 2017.

SRINIVAS, P.; RIVARD, K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. **International Journal of Antimicrobial Agents**, p. 7–9, 2017.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991.

WOODFORD, N.; FAGAN, E. J.; ELLINGTON, M. J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases [4]. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 154–155, 2006.

YANG, Y. et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7 . 1 in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1791–1795, 2018.

YOUSFI, H. et al. Colistin- and Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumonia* Clinical\_Isolates: Algeria. **Microbial Drug Resistance**, p. 1–6, 2018.

## 6 CONCLUSÃO

- Os parâmetros dos testes estatísticos demonstraram que o teste de ágar diluição (teste da gota) pode ser proposto como um método de triagem na detecção de microrganismos resistentes às polimixinas;

- A concentração de 4.0 µg/mL de colistina e polimixina B para o teste da gota teve resultados superiores ao sistema Vitek 2®, e que podem ser utilizados com confiança na prática dos laboratórios clínicos, ressaltando que o teste é uma alternativa de técnica simples, de fácil interpretação e de custo reduzido para o rastreio da resistência às polimixinas em relação aos sistemas automatizados e microdiluição em caldo;

- Os resultados da avaliação de dados clínicos e epidemiológicos indicaram que os pacientes internados na UTI tiveram maior prevalência de KpRCP em relação aos demais pacientes internados em outros locais;

- O óbito e uso prévio de colistina e/ou polimixina, seguido de carbapenems, foram características encontradas na maioria dos pacientes deste estudo;

- O estudo da variabilidade genética, por ERIC-PCR, demonstrou uma grande diversidade genética nos isolados avaliados;

- Todos os isolados de KpRCP do estudo transportavam o gene *bla<sub>KPC</sub>*;

- Apesar de todos os isolados serem resistentes às polimixinas nenhum gene via plasmidial do tipo *mcr-1* foi identificado no trabalho, portando sugere que o mecanismo de resistência seja por via cromossomal;

- Os estudos epidemiológicos, bem como testes fenotípicos para a detecção da resistência microbiana em isolados multirresistentes, constitui importantes ferramentas utilizadas no controle da disseminação de mecanismos de resistência.

## REFERÊNCIAS

- AH, Y.; KIM, A.; LEE, J. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 1, p. 8–15, 2014.
- ALVES, A. P.; BEHAR, P. R. P. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de Kpc em um hospital terciário do sul do Brasil. **Revista da AMRIGS**, p. 213-218, 2013.
- AURÉLIE, J. et al. Comparison of methods for detection of plasmid-mediated and chromosomally-encoded colistin resistance in Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology and Infection**, p. 175-179, 2018.
- BAND, V. I. et al. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Exhibiting Clinically Undetected Colistin Heteroresistance Leads to Treatment Failure in a Murine Model of Infection. **American Society for Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 1–6, 2018.
- BARAN, I.; NERIMAN, A. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level reference hospital in Turkey. **Clinical Microbiology and Antimicrobials**, p. 3-11, 2016.
- BARON, S. et al. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p. 583–591, 2016.
- BENGOECHEA, J. ; PESSOA, J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. **Journals Investing in Science**, p. 1-22, 2018.
- BLAIR, J. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2014.
- BRAUN, G. et al. Temporal evolution of polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones recovered from blood cultures in a teaching hospital during a 7-year period. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 3, p. 522–527, 2018.
- BRISSE, S.; PASSET, V.; GRIMONT, P. A. D. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, p. 3146–3152, 2014.
- BRISSE, S.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. The genus *klebsiella*: taxonomic History and Structure. **Springer New York**. v. 6, p. 159-196, 2006.
- BULIK, C. et al. Comparison of Meropenem MICs and Susceptibilities for Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates by Various Testing Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 7, p. 2402–2406, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of Beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.

CANTÓN, R.; COQUE, T. M. The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 466–475, 2006.

CODJOE, F. S.; DONKOR, E. S. medical sciences Carbapenem Resistance : A Review. **Medical Sciences**, p. 1–28, 2018.

D'ANDREA, M. M. et al. CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 305–317, 2013.

ESPOSITO, F. et al. Detection of Colistin- Resistant MCR-1 Positive Escherichia coli Using Inhibition by EDTA and Zeta Potential Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 3454–3465, 2017.

FALAGAS, M. E.; RAFAILIDIS, P. I.; MATTHAIYOU, D. K. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 4–5, p. 132–138, 2010.

FARMER, J. J. *Enterobacteriaceae*: Introduction and Identification In: MURRAY, R. P. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 ed. Washington, American Society for Microbiology, p.442-458, 1999.

GALES, A. C.; JONES, R. N. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 2070–2074, 2011.

GALES, C. A. et al. ,Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 354-360, 2012.

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

GIAKKOUI. P. et al. An update of the evolving epidemic of *bla*KPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 66,n 7, p. 1510-1513, 2011.

HAN, J. H. et al. Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in a Network of Long-Term Acute Care Hospitals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, p. 839–844, 2017.

HENNEQUIN, C.; ROBIN, F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. **European Journal Clinical Microbiology eInfectious Diseases**, p. 333–341, 2016.

INSTRUÇÕES NORMATIVAS 45 DE 22 DE NOVEMBRO DE 2016, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA), Edição: 229, Seção: 1, p. 6, 2016.

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

KIM, D. et al. Antimicrobial resistance and virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* affecting 30 day mortality in patients with bloodstream infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1–10, 2018.

KINOSHITA, Y. et al. Study of the structure-activity relationship of polymyxin analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, p. 2–5, 2018.

LEE, C. et al. Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Determinants, and Resistance Mechanisms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 1-13, 2017.

LESCAT, M. et al. Performances of the Rapid Polymyxin *Acinetobacter* and *Pseudomonas* Tests for Colistin Susceptibility Testing. **Microbial Drug Resistance**, p. 1–4, 2018.

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

LIVERMORE, D. M.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p.557-584, 1995.

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 p. 161-168, 2016.

MEYER, K.S.; URBAN, C.; EAGAN, J.; BERGER, B. J.; RAHAL, J.J. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* infection resistant to late-generation cephalosporins. **Annals of Internal Medicine**, v.119, p. 353-358, 1993.

MONTEIRO, J. et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 906–909, 2012.

MORAES et al., Estudo molecular e epidemiológico de isolados clínicos resistentes aos carbapenêmicos e as polimixinas. **Journal of Infection Control**, p. 58-59, 2018.

NAUMOVSKI, L.; QUINN, J. P.; MIYASHIRO, D.; PATEL, M., BUSH, K.; SINGER, S.; GRAVES, D.; PALZKILL, T.; ARVIN, A. M. Outbreak of ceftazidime resistance due to novel extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in isolates from cancer patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.36, p. 1991-1996, 1992.

NORDMANN, P.; JAYOL, A.; POIREL, L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 6, 2016.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.

Paczosa, K. M.; Mecsas, J. Klebsiella pneumonia : Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629-662, 2016.

PALZKILL, T.  $\beta$ -Lactamases are changing their activity spectrums. **American Society for Microbiology**, v.64, p. 90-95, 1998.

PALZKILL, T. Structural and Mechanistic Basis for Drug-Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM , CTX-M , and KPC  $\beta$  -lactamases. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 5, p. 1–19, 2018.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **Clinical Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

PODSCHUN, R. et al. Incidence of *Klebsiella* Species in Surface Waters and Their Expression of Virulence Factors. **American society for Microbiology**, v. 67, p. 3325-3327, 2001.

POIREL, L. et al. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 75–80, 2015.

ROJAS, L. J. et al. Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory Detection and Impact on Mortality. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, p. 711–718, 2017.

SRINIVAS, P.; RIVARD, K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. **International Journal of Antimicrobial Agents**, p. 7–9, 2017.

SUN. J. et al. Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. **Trends Microbiology**, p. 794-808, 2018.

SULTAN, I. et al. Antibiotics , Resistome and Resistance Mechanisms : A Bacterial Perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. September, 2018.

TIAN, X. et al. Epidemiology of and risk factors for infection with extended-spectrum  $\beta$  -lactamase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: results of a double case – control study. **Infection and Drug Resistance**, p. 1339–1346, 2018.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991.

WANG, R. et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. **Nature Communications**, p. 1–9, 2018.

WOODFORD, N.; FAGAN, E. J.; ELLINGTON, M. J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases [4]. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 154–155, 2006.

YANG, Y. et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7* . 1 in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1791–1795, 2018.

YOUSFI, H. et al. Colistin- and Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates: Algeria. **Microbial Drug Resistance**, p. 1–6, 2018.

ZHAO, Z. et al. Evaluation of automated systems for aminoglycosides and fluoroquinolones susceptibility testing for Carbapenem- resistant *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, p. 4–9, 2017.