

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**Avaliação do perfil de sensibilidade e caracterização molecular de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de KPC isoladas de corrente sanguínea em quatro hospitais de Porto Alegre**

**Laura Czekster Antochewis**

Porto Alegre

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**Avaliação do perfil de sensibilidade e caracterização molecular de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de KPC isoladas de corrente sanguínea em quatro hospitais de Porto Alegre**

**Laura Czekster Antochewis**

**Orientador: Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre

2017

## CIP - Catalogação na Publicação

Czekster Antochevis, Laura

Avaliação do perfil de sensibilidade e caracterização molecular de isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de KPC isoladas de corrente sanguínea em quatro hospitais de Porto Alegre / Laura Czekster Antochevis. -- 2017.

46 f.

Orientador: Alexandre Prehn Zavascki.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. polimixinas. 2. resistência. 3. aminoglicosídeos. 4. *Klebsiella pneumoniae*. 5. carbapenemase. I. Prehn Zavascki, Alexandre, orient.  
II. Título.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu querido “profê” Alexandre Zavascki, pela paciência em apontar meus erros para me ver crescer, pela dedicação de sempre me ceder o seu tempo em meio a tantos compromissos, por me aguentar nos últimos dias de *stress*, por apostar em mim, por me inspirar. Profe, obrigada por trilhar comigo esse caminho difícil de intenso estudo e esforço. É uma honra ser tua aluna, mestre.

Ao outro querido “profê” Afonso Barth, pelos inúmeros conselhos, pelas conversas de manhã cedo, pelos cafezinhos e pela amizade. Profe, tu és inspirador, um profissional ético e comprometido, um paizão para todo o laboratório. Obrigada, de todo coração!

À amada equipe do LABRESIS e Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que foi um grande apoio técnico e emocional nas várias horas de experimentos. Em especial à minha grande amiga Cibele, outra fonte inspiradora de força, perseverança e estudos, mas, além disso, uma carinhosa fonte de conselhos, intermináveis conversas e abraços confortadores.

À equipe do Laboratório Weinmann, que me forneceu todo apoio para a conclusão dos experimentos e das disciplinas, mas sobretudo me motivou e me animou. Em especial à minha querida amiga Lisiane, que ouviu todas as minhas lamentações e com paciência me deu forças para continuar.

À minha família. Renê, Heloiza e Helena, sem vocês eu não chegaria aqui. Esta conquista também é de vocês: meus melhores amigos e maiores incentivadores, a quem eu sempre recorria e de quem eu sempre ouvia “vá à luta”. Que eu possa retribuir a vocês todo o amor que sempre recebi. Obrigada por me fazerem tão feliz.

## RESUMO

*Klebsiella pneumoniae* (KP) pertence à família *Enterobacteriaceae* e é frequentemente isolada em infecções nosocomiais, reportada globalmente como uma das mais importantes causas de bacteremias. O seu tratamento usual com  $\beta$ -lactâmicos foi posto a prova na década de 80, com o surgimento de cepas produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs), e posteriormente com as carbapenemases, como sua principal representante *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC), capazes de hidrolisar todos os  $\beta$ -lactâmicos. Apesar das limitadas opções, em geral as *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC (KP-KPC) apresentam susceptibilidade às polimixinas, aminoglicosídeos e tigeciclina, que são comumente aplicadas em regimes terapêuticos combinados, dependente dos perfis de sensibilidade ou resistência a estas drogas, mas dos quais ainda não há informações suficientes para a definição do tratamento mais adequado. A escassez de opções terapêuticas é um dos fatores que contribuem para os altos índices de mortalidade das infecções por *K. pneumoniae*, de cerca de 40%. Assim, se fazem necessárias avaliações dos perfis fenotípicos de isolados de KP-KPC e a caracterização da disseminação deste mecanismo de resistência, avaliando a presença de perfis clonais relacionados dentro da população. A partir deste cenário, os objetivos deste trabalho foram determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) frente à polimixina B (PMB), meropenem (MEM) e tigeciclina (TGC), os perfis de sensibilidade frente a outras drogas comumente utilizadas no tratamento destas infecções, assim como caracterizar molecularmente as amostras resistentes à PMB. Para a determinação das CIMs e dos perfis de susceptibilidade foram utilizadas as técnicas de microdiluição em caldo e disco-difusão, respectivamente, e o perfil molecular foi analisado através de técnica de macrorestrição de DNA seguida por PFGE. Foram incluídas neste estudo 158 amostras isoladas de corrente sanguínea, de quatro hospitais terciários de Porto Alegre. Destas 158 amostras, nenhuma foi sensível a MEM de acordo com o *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), 118 (74,7%) a PMB utilizando a recomendação do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), e 94 (59,5%) à TGC considerando EUCAST ou 137 (86,7%) de acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA). Um total de 48 (30,4%), 28 (17,7%) e 16 (10,1%) isolados foram considerados sensíveis à amicacina (AMK) de acordo com CLSI, EUCAST e USCAST, respectivamente, e 11 (7,0%), 9 (5,7%) e 9 (5,7%) reportados como sensíveis à gentamicina (GEN) de acordo com CLSI, EUCAST e USCAST, respectivamente.

Doxiciclina foi o antimicrobiano mais ativo (24, 60.0%) frente aos 40 (25,3%) isolados resistentes a PMB. Destes 40 isolados, 29(72.5%) foram caracterizados molecularmente sendo encontrados 18 clones, dos quais cinco perfis clonais foram identificados em mais de um hospital. Neste estudo, pudemos demonstrar um importante aumento nos níveis de resistência às polimixinas, acompanhado por um desafiador perfil de susceptibilidade frente as outras opções terapêuticas disponíveis, ainda que os índices de sensibilidade destas drogas variem de acordo com os pontos de corte de cada comitê. Quanto à caracterização molecular, a detecção de dezoito clones diferentes e a presença do mesmo perfil em mais de um hospital provavelmente estão associadas à emergência de resistência mediada por mutações, assim como a um processo de disseminação horizontal.

## ABSTRACT

*Klebsiella pneumoniae* (KP) belongs to the family *Enterobacteriaceae* and is frequently isolated in nosocomial infections, reported globally as one of the most important causes of bacteremia. Its usual  $\beta$ -lactam treatment was challenged in the 1980s with the emergence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing (ESBLs) strains, and later with carbapenemases, as its main representative *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), capable of hydrolyze all  $\beta$ -lactam. Despite the limited options, KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC-KP) are generally susceptible to polymyxins, aminoglycosides and tigecycline, which are commonly applied in combination therapy regimens depending on levels of sensitivity or resistance to these drugs, but of which there is still insufficient information to define the most appropriate treatment. The scarcity of therapeutic options is one of the factors that contribute to the high mortality rates of *K. pneumoniae* infections, of around 40%. Thus, it is necessary to evaluate the phenotypic profiles of KPC-KP isolates and the characterization of the dissemination of this resistance mechanism, evaluating the presence of related clonal profiles within the population. From this scenario, the objectives of this study were to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs) against polymyxin B (PMB), meropenem (MEM) and tigecycline (TGC) by broth microdilution and the susceptibility profiles to aminoglycosides and other drugs by disk-diffusion method, as well as to evaluate the molecular profile of KPC-KP isolates from four tertiary hospitals in Porto Alegre. A total of 158 samples were included in this study, where none were sensitive to MEM according to the *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), 118 (74.7%) to PMB using the recommendation of the *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), and 94 (59.5%) to TGC considering EUCAST or 137 (86.7% %) according to *Food and Drug Administration* (FDA). A total of 48 (30.4%), 28 (17.7%) and 16 (10.1%) isolates were considered susceptible to amikacin (AMK) according to CLSI, EUCAST and USCAST, respectively, and 11 (7.0%), 9 %) and 9 (5.7%) reported as sensitive to gentamicin (GEN) according to CLSI, EUCAST and USCAST, respectively. Doxycycline was also the most active antimicrobial (24, 60.0%) against 40 (25.3%) PMB resistant isolates. Of these 40 isolates, 29 (72.5%) were clonally related, resulting in 18 clones, where five profiles were identified in more than one hospital. In this study, we could demonstrate an important increase in the levels of resistance to polymyxins, accompanied by a challenging profile of susceptibility to

other drugs, although the sensitivity indexes of the latter vary significantly according to the breakpoints of each committee. As for molecular characterization, the detection of eighteen different clones and the presence of the same profile in more than one hospital are probably associated with the emergence of resistance mediated by mutations, as well as a process of horizontal dissemination.

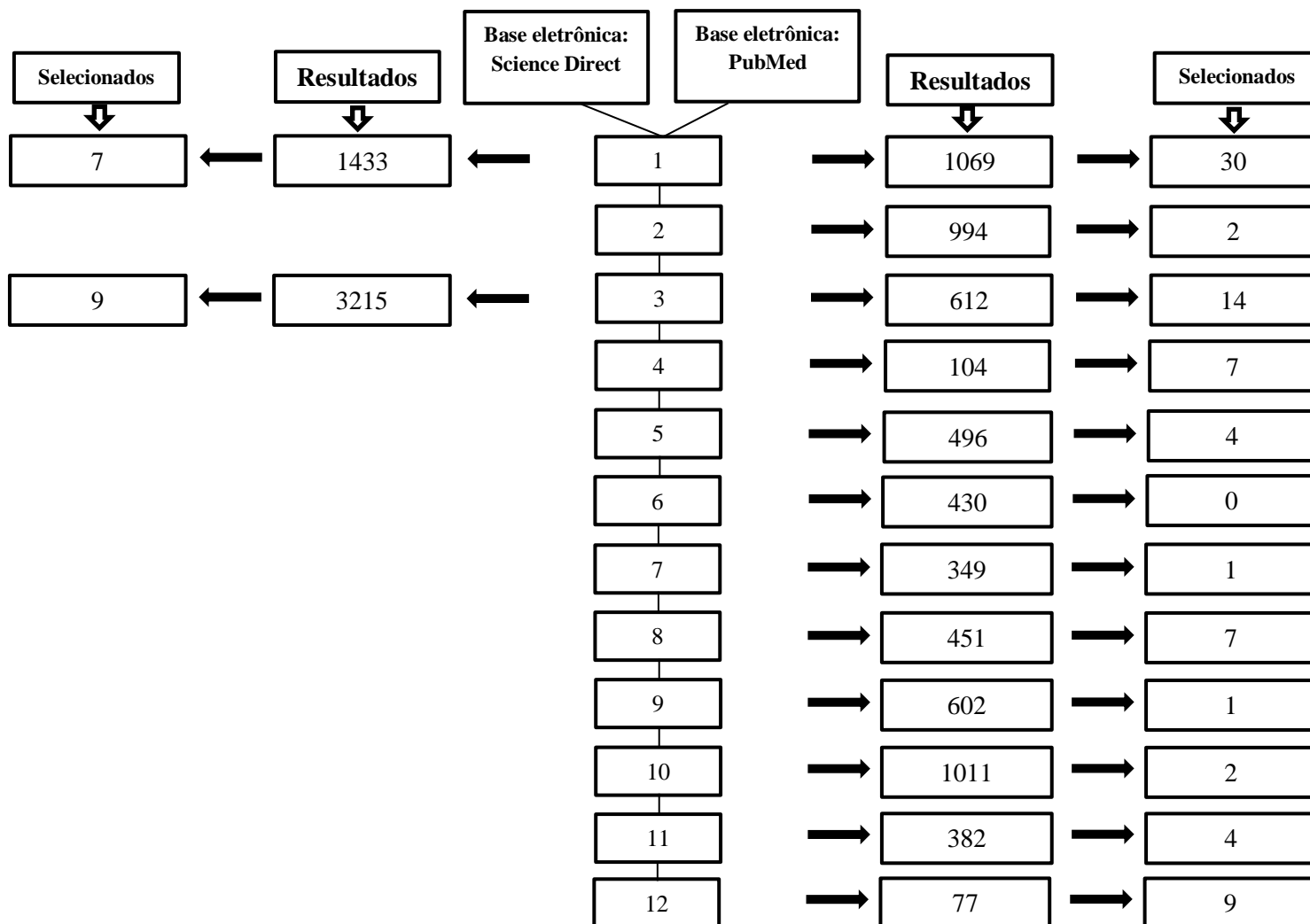


## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. REVISÃO DA LITERATURA .....  | 9  |
| 1.1 Fluxo de seleção dos artigos da revisão literária sistemática .....                                     | 9  |
| 1.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....  | 10 |
| 1.2.1 Microbiologia e Epidemiologia .....   | 10 |
| 1.2.2 Mecanismos de resistência .....   | 11 |
| 1.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC) .....  | 12 |
| 1.3.1 Características da enzima .....   | 12 |
| 1.3.2 Epidemiologia .....   | 12 |
| 1.3.3 Epidemiologia molecular.....  | 13 |
| 1.3.3.1 Epidemiologia molecular de KP-KPC no Brasil.....  | 14 |
| 1.3.4 Opções terapêuticas no tratamento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de KPC .....             | 15 |
| 1.3.4.1 Características dos antibióticos .....  | 15 |
| 1.3.4.1.1 Polimixinas .....   | 15 |
| 1.3.4.1.2 Aminoglicosídeos .....  | 16 |
| 1.3.4.1.3 Tigeciclina .....   | 16 |
| 1.3.4.1.4 Carbapenêmicos .....  | 17 |
| 1.3.4.2 Uso de polimixinas, tigeciclina, aminoglicosídeos e carbapenêmicos para o tratamento de KP-KPC..... | 17 |
| 1.3.4.2.1 Polimixinas .....   | 17 |
| 1.3.4.2.2 Aminoglicosídeos .....  | 19 |
| 1.3.4.2.3 Tigeciclina .....   | 20 |
| 1.3.4.2.4 Carbapenêmicos .....  | 21 |
| 2. JUSTIFICATIVA .....  | 23 |
| 3. OBJETIVOS .....  | 24 |
| 3.1 Objetivos gerais .....  | 24 |
| 3.2 Objetivos específicos .....   | 24 |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 25 |
| 5. ARTIGO .....   | 31 |

# 1. REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1. Fluxo de seleção dos artigos da revisão literária sistemática



### Filtro:

- Publicados há menos de 10 anos

### Critério de seleção:

- Artigos que abordassem a temática em seus títulos

### Referências identificadas por busca em outras fontes:

- 25

### Palavras-chave:

- 1) *Klebsiella pneumoniae* AND KPC
- 2) KPC carbapenemase
- 3) *polymyxin b* AND resistance
- 4) *polymyxin b* AND resistance AND *Klebsiella pneumoniae*
- 5) *aminoglycoside* AND *Klebsiella pneumoniae*
- 6) *amikacin* AND *Klebsiella pneumoniae*
- 7) *gentamicin* AND *Klebsiella pneumoniae*
- 8) *tigecycline* AND *Klebsiella pneumoniae*
- 9) *meropenem* AND *Klebsiella pneumoniae*
- 10) *carbapenem treatment* AND *Klebsiella pneumoniae*
- 11) *clonal* AND *Klebsiella pneumoniae*
- 12) *Klebsiella* AND carbapenemase OR KPC AND Brazil

## 1.2 *Klebsiella pneumoniae*

### 1.2.1 Microbiologia e Epidemiologia

*Klebsiella pneumoniae* é um dos bacilos Gram-negativos mais frequentemente isolados em infecções nosocomiais (1), responsável por uma grande variedade de infecções, como pneumonias e bacteremias, particularmente em pacientes imunocomprometidos (2, 3). Trata-se de um microrganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, encapsulado, imóvel, ubíquo e oportunista, capaz de sobreviver por longos períodos no ambiente hospitalar (2-5).

Estudos recentes mostram que essa espécie pode carrear inúmeros genes acessórios, que permitem sua adaptação a vários ambientes, podendo responder a situações de estresse como antibioticoterapia (3). Isolados de *K. pneumoniae* são capazes de produzir diversos fatores de virulência e resistência, como expressão de cápsula, sideróforos, adesinas, lipopolissacarídeos, hiper mucoviscosidade e mecanismos de resistência aos antimicrobianos (5, 6). Em pacientes hospitalizados, os principais sítios de colonização de *K. pneumoniae* são o trato gastrointestinal, a pele e a nasofaringe (4), podendo ser transferida entre pacientes através de equipamentos médicos ou pelo contato com a equipe assistente, colonizando as superfícies mucosas rapidamente e, assim, demonstrando seu grande potencial patogênico e de disseminação (2, 3). Tratamentos prévios com antibióticos também tem sido apontados como mais uma das fontes para colonização por *Klebsiella* sp. em hospitais (7). Esta bactéria ainda possui uma significativa heterogeneidade fenotípica devido aos diferentes mecanismos de resistência que pode expressar (2).

Embora não seja tão frequente, *K. pneumoniae* é responsável por graves infecções comunitárias, como pneumonia necrotizante, abscessos hepáticos e endoftalmite (4, 8, 9). Já dentro da área hospitalar, esta enterobactéria é bastante encontrada e está associada principalmente aos tratos urinário e respiratório, sítios cirúrgicos e meningites (4, 8, 10, 11). Em infecções de corrente sanguínea adquiridas no hospital e na comunidade, *K. pneumoniae* é o segundo agente mais comumente encontrado dentre os Gram-negativos (12-14). As infecções em corrente sanguínea representam uma das principais fontes de doenças infecciosas nosocomiais e comunitárias, associadas a índices de mortalidade de 20 a 40% (4, 13, 15, 16). Em um estudo de prevalência de infecções em unidades de cuidados intensivos (UCIs), que coletou dados de 75 países, infecções em corrente sanguínea apareceram como o

terceiro foco mais comum, observado em 15% dos pacientes infectados (17). No Brasil, *K. pneumoniae* foi reportada como o terceiro (14,2%) principal agente etiológico observado em infecções sanguíneas relacionadas a cateteres em UCIs, sendo o mais frequente nas regiões Norte e Centro-Oeste do país, com taxas de 16,0% e 18,8%, respectivamente (18).

### 1.2.2 Mecanismos de resistência

Embora *K. pneumoniae* apresente resistência intrínseca apenas à ampicilina (8), estudos de vigilância apontam que, desde o início dos anos 2000, são reportados índices de 20 a 80% de resistência de isolados de *K. pneumoniae* a antibióticos como cefamicinas, cefalosporinas, monobactams (aztreonam) e carbapenêmicos (4). Estes índices devem-se principalmente à disseminação de mecanismos de resistência, como a produção de enzimas denominadas  $\beta$ -lactamases, as quais são capazes de hidrolisar os  $\beta$ -lactâmicos (19).

Até os anos 80, era incomum encontrar isolados de *K. pneumoniae* apresentando fenótipos de resistência clinicamente relevantes, visto que produziam pouca quantidade de  $\beta$ -lactamases cromossomais (9). Porém, é nesta década que emergem as *extended-spectrum  $\beta$ -lactamases* (ESBL), uma classe de  $\beta$ -lactamases capazes de inativar  $\beta$ -lactâmicos como penicilinas, cefalosporinas (com exceção de cefamicinas) e aztreonam, sendo observados diferentes graus de hidrólise a cada uma das drogas, de acordo com o tipo de enzima (20). Seu primeiro relato no Brasil ocorreu em 1994, em isolados de enterobactérias resistentes a ceftazidima (21). Entre isolados de *Klebsiella* sp., as ESBL mais prevalente são as do grupo CTX-M (19, 20, 22).

Já nos anos 2000, emergem as carbapenemases, que dentre as  $\beta$ -lactamases constituem a classe de maior importância clínica, visto que, em geral, são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactamicos, carbapenêmicos e ácido clavulânico, conferindo aos isolados um fenótipo multirresistente. As principais carbapenemases encontradas na família *Enterobacteriaceae* são divididas em três classes: classe A (serino- $\beta$ -lactamases), classe B (metalo- $\beta$ -lactamases) e classe D (oxacillinases) (22-24). Indiscutivelmente, a carbapenemase de maior importância clínica e epidemiologia é a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), que foi reportada pela primeira vez em 2001 por um grupo americano (25). Devido a relevância desta enzima, ela será melhor detalhada no item a seguir.

### **1.3 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)**

#### **1.3.1 Características da enzima**

A KPC é a carbapenemase de classe A mais comumente encontrada mundialmente, que obteve este nome por ser detectada pela primeira vez em elementos móveis plasmidiais em isolado de *K. pneumoniae* (24-26). A hidrólise de carbapenêmicos realizada pela KPC determina, em geral, aumento das concentrações inibitórias mínimas aos carbapenêmicos, porém, altos níveis de resistência (por exemplo, CIM  $\geq$ 16mg/L) usualmente ocorrem quando outros mecanismos de resistência não relacionados a atividades enzimáticas também se encontram presentes, notadamente alterações em porinas da membrana externa. (23, 25, 27, 28). A rápida disseminação desta enzima é mediada principalmente por elementos genéticos móveis, como *Tn4401*, e também via transferência horizontal de plasmídeos de diferentes grupos de incompatibilidade, contendo o gene codificador *bla*<sub>KPC</sub> (29, 30). Já foram descritas mais de 20 variantes da KPC, as quais apresentam mutações pontuais de uma mesma sequência de aminoácidos, sendo as variantes KPC-2 e KPC-3 as mais frequentes (2, 25, 26).

#### **1.3.2 Epidemiologia**

Desde o primeiro relato de caso de *K. pneumoniae* produtora de KPC nos Estados Unidos em 1996, sua disseminação global resulta em frequentes surtos hospitalares e cenários endêmicos em regiões dos Estados Unidos, Itália, Grécia, Colômbia, Israel, entre outros países (8, 22, 31). Dados de 2014 demonstram que, na região da Itália, aproximadamente 20%–30% de todas as amostras de *K. pneumoniae* isoladas de corrente sanguínea são produtoras de KPC-2 ou KPC-3 (32). Um estudo do programa SENTRY realizado no período de 2007 a 2009 avaliou 5516 *Klebsiella* sp. provenientes dos EUA, Europa e América Latina, das quais 294 (5,3%) eram resistentes aos carbapenêmicos e 156 (2,8%) portadoras de KPC, relatando a ocorrência de 10 isolados brasileiros em 2009 (29). Subsequentemente a este estudo, o mesmo programa de monitoramento avaliou 5705 isolados latino-americanos, e detectou 54 isolados KP-KPC, sendo 39 brasileiros (11).

No Brasil, o primeiro caso de KPC-2 foi relatado 10 anos após a publicação da descrição original desta enzima, em quatro pacientes da cidade de Recife (33, 34). Em 2009, Pavez *et al* puderam evidenciar que isolados contendo KPC já circulavam no Brasil desde 2005 (35). Embora esta enzima já tenha sido reportada em diversas espécies de enterobactérias, *K. pneumoniae* é a espécie mais frequente, sendo identificados isolados de KP-KPC em praticamente todas as regiões brasileiras, (36-40). Atualmente, o Brasil ocupa uma posição entre os países com maior prevalência de KPC (22), apresentando níveis endêmicos do subtipo KPC-2 (39).

A emergência de isolados de KP-KPC tem representado um grande desafio terapêutico, em vista de seu alto nível de resistência a todos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo diferentes níveis frente aos carbapenêmicos (41). Um estudo epidemiológico do programa SENTRY que incluiu hospitais brasileiros, espelhou o que vem ocorrendo em diversos hospitais brasileiros nos últimos anos, a saber, um aumento na taxa de resistência aos carbapenêmicos devido à presença de KPC em isolados de *K. pneumoniae* (11). Outro estudo avaliou 3085 isolados de KP-KPC durante o período de 2011 a 2015, e demonstrou um aumento na taxa de resistência aos carbapenêmicos ao longo dos anos, de 6,8% para 35,5%, o que se explica em parte pela presença de KPC em 96,2% das amostras de *K. pneumoniae* só no último ano de análise (42). No trabalho de 2014 de Seibert *et al*, KP-KPC foi o microrganismo com maior resistência aos carbapenêmicos (60%) dentre 47 isolados nosocomiais avaliados (43). Outros estudos também corroboram a importante associação entre *K. pneumoniae* e KPC no Brasil. Em 2015, Arend *et al* demonstraram a prevalência de 92,39% de isolados de KP entre 770 enterobactérias produtoras de KPC resistentes aos carbapenêmicos (44), assim como Magagnin *et al* também evidenciaram os altos índices de 93,7% de KPC no sul do país, em 2982 amostras de enterobactérias produtoras de carbapenemases, isoladas de 28 hospitais do Rio Grande do Sul (45).

Atualmente, sabe-se que *K. pneumoniae* é responsável por cerca de 85% das infecções por microrganismos multirresistentes e que são reportados índices de mortalidade de mais de 40% em pacientes com infecções por KP-KPC (46-48).

### **1.3.3 Epidemiologia molecular**

A análise epidemiológica de amostras de KP-KPC com relação aos seus perfis de clonalidade vem sendo abordada principalmente em estudos da última década, em diferentes países, que relatam a ocorrência de similaridade entre seus grupos de isolados, evidenciando um potencial de disseminação horizontal (42, 49). A distribuição global de diferentes isolados bacterianos pode ser analisada através da comparação entre *sequence types* (ST), classificação definida pela sequência de nucleotídeos característica de cada cepa de determinada espécie, relacionando-as clonalmente, que por sua vez farão parte de diferentes grupos clonais (GC) (2, 22). Até o momento, sabe-se que a disseminação de isolados de KP-KPC geralmente ocorre por meio de clones específicos (50).

Embora já existam relatos da presença desta carbapenemase em mais de 115 STs diferentes de *K. pneumoniae*, a ST de KP-KPC mais frequentemente encontrada ao redor do mundo é a ST258, principal representante do GC258. Quando produtora de KPC-2 ou KPC-3, esta ST aparece como uma das principais fontes responsáveis pela disseminação global de KP-KPC, devido as suas características de persistir e disseminar no meio, causando surtos hospitalares (2, 22, 28). Amostras pertencentes a esta linhagem clonal apresentam resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos, além de geralmente carregarem genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e apresentarem mutações cromossômicas que conferem resistência às fluoroquinolonas (30). Ainda não se compreende totalmente os mecanismos que levam ao predomínio da ST258 sobre outras linhagens de KP multirresistentes (8, 16). A ST258 foi identificada em 70% das cepas KP-KPC nos Estados Unidos em 2009 e 90% em Israel, assim como foi responsável por diversos surtos hospitalares em diferentes países ao redor do mundo na última década, como Grécia e Brasil, caracterizando o alto risco deste clone (4, 16, 50).

### **1.3.3.1 Epidemiologia molecular de KP-KPC no Brasil**

No Brasil, as *sequence types* mais frequentemente relatadas são a ST11, também pertencente ao GC258, a ST340 e a ST437 (4, 6, 33,50). A primeira descrição da ocorrência da ST258 no Brasil foi em 2011, associada a um surto hospitalar em São Paulo. Neste estudo também foram analisadas 64 amostras de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, provenientes dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio

Grande do Sul, sendo que 89,5% das *K. pneumoniae* pertenciam à ST258(51). Em 2014, Andrade *et al.* avaliaram 7 isolados de *K. pneumoniae* resistentes à quinolonas, polimixina B e carbapenêmicos, relacionados a ST11. Estas amostras foram isoladas no mesmo hospital de São Paulo onde fora reportada a primeira ocorrência da ST258 no Brasil (52). Outro estudo de vigilância, realizado em 2012 captou amostras de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos de mais de 50 países, incluindo 63 amostras do Brasil, nas quais foi reportada a presença da ST11 (45 isolados), seguido da ST258 (7 isolados) e ST437 (7 isolados) e, em menor frequência, a ST340 (53). Um estudo mais recente realizado no estado do Paraná, que avaliou 26 isolados de *K. pneumoniae* obtidos de diferentes sítio de infecção, detectou 8 diferentes STs (ST11, ST15, ST101, ST258, ST340, ST874, ST442 e ST978) em apenas um hospital avaliado, evidenciando a policlonalidade dos isolados de *K. pneumoniae* e corroborando a ocorrência de STs de alto risco no Brasil (6). Nesta mesma região, em 2015, Arend *et al* também relataram a ocorrência de disseminação policlonal de isolados KP-KPC em 14 hospitais da cidade do Paraná. O grupo identificou sete clones, seis detectados em mais do que dois hospitais (54).

### **1.3.4 Opções terapêuticas no tratamento de KP-KPC**

Além do perfil fenotípico induzido pela presença da carbapenemase, isolados de KP-KPC tem seu espectro de resistência aumentado, incluindo fluoroquinolonas, por exemplo, quando associados a outros mecanismos de resistência (55). Apesar das limitadas opções, em geral as KP-KPC apresentam susceptibilidade às polimixinas (atual base terapêutica no tratamento destas infecções), aminoglicosídeos e tigeciclina. , (56). Aminoglicosídeos e tigeciclina, juntamente com os carbapenêmicos, são usados frequentemente em associação com as polimixinas.(48, 55).

#### **1.3.4.1 Características dos antibióticos**

##### **1.3.4.1.1 Polimixinas**

Polimixina B e polimixina E (colistina) são as drogas que compõem a classe antimicrobiana das polimixinas (57), as quais foram descobertas em 1947, retiradas de



uso nos anos 70 devido à sua toxicidade, e reimplementadas na prática clínica nos anos 2000 como alternativa para o tratamento de cepas multirresistentes (58, 59). Tratam-se de moléculas polipeptídicas que agem sobre bactérias Gram-negativas, desestabilizando componentes da membrana externa (lipopolissacarídeos) através de interação eletrostática, assim aumentando a permeabilidade e causando morte celular (60). As polimixinas também atuam neutralizando o lipídio A, uma endotoxina presente no lipopolissacarídeo, além de inibir enzimas da via respiratória presentes na membrana interna da bactéria (61). Colistina e polimixina B são bastante similares estruturalmente, diferindo apenas na composição de um aminoácido (leucina em colistina e fenilalanina em PMB), porém apresentam algumas diferenças quanto as suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas (57, 58). Colistina é administrada como a pró-droga colistimetato, enquanto PMB é diretamente infundida em sua forma ativa, conseqüentemente impactando no tempo para obtenção de concentrações plasmáticas adequadas, assim como na dimensão da ocorrência de efeitos adversos (57). As polimixinas são drogas bastante nefrotóxicas por acumularem-se facilmente nas células tubulares renais, levando à diferentes graus de injúria renal aguda em cerca de 50-60% dos pacientes (58, 60). Contudo, existe um crescente número de estudos indicando que PMB seria menos nefrotóxica em pacientes, quando comparada à colistina (57, 58).

#### **1.3.4.1.2 Aminoglicosídeos**

Os aminoglicosídeos comumente prescritos em infecções por Gram-negativos são gentamicina, tobramicina e amicacina, que atuam sobre a síntese proteica dos micro-organismos (56). Até a década de 80, estas drogas eram amplamente utilizadas para o tratamento de bacteremias por bacilos Gram-negativos, porém, traziam como desvantagens efeitos tóxicos importantes e baixa perfusão em sítios de infecção abdominais e pulmonares, relegando-os a terapias de segunda linha (62, 63).

#### **1.3.4.1.3 Tigeciclina**

A classe antimicrobiana de gliciliclinas tem como seu primeiro e mais relevante representante a tigeciclina (64), droga de amplo espectro que age sobre a síntese protéica e apresenta boa penetração tecidual, sendo indicada principalmente no tratamento de infecções de pele, abdominais e pneumonias adquiridas na comunidade

(65). Apresenta boa atividade *in vitro* frente a microrganismos Gram-negativos multirresistentes (66), mas não atinge concentrações urinárias e séricas adequadas quando utilizadas as doses recomendadas pela bula (26, 48).

#### **1.3.3.1.4 Carbapenêmicos**

Os carbapenêmicos apresentam amplo espectro de ação frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo considerados os antibióticos de escolha na maioria das infecções por germes multirresistentes (27, 67). Assim como todos os  $\beta$ -lactâmicos, seu mecanismo de ação consiste na ligação do carbapenêmico a proteínas de ligação da penicilina presentes na membrana celular, interferindo na síntese bacteriana de peptidoglicanos (68). Esta classe de antimicrobianos apresenta relevante resistência à hidrólise por  $\beta$ -lactamases, são administrados apenas por via intravenosa ou intramuscular, e tem como principais representantes aplicados clinicamente o ertapenem, imipenem, doripenem e meropenem (27).

#### **1.3.4.2 Uso de polimixinas, tigeciclina, aminoglicosídeos e carbapenêmicos para o tratamento de KP-KPC**

##### **1.3.4.2.1 Polimixinas**

No Brasil, a solução injetável de PMB é comumente utilizada, porém, a maioria das informações farmacodinâmicas referentes às polimixinas são baseadas em estudos utilizando a colistina, visto que esta é a polimixina mais utilizada ao redor do mundo (59). Devido à crescente incidência de KP-KPC, cujo tratamento frequentemente se restringe às polimixinas, atualmente já são encontrados estudos clínicos com PMB em monoterapia e combinada a outros antibióticos (58). Contudo, ainda não foram estabelecidos pontos de cortes interpretativos para polimixina B quando testados isolados de enterobactérias. Atualmente, o CLSI não possui pontos de corte clínicos definidos de polimixinas para enterobactérias, e EUCAST publicou pontos de corte apenas para colistina. Alternativamente os critérios utilizados para colistina são extrapolados para interpretação da polimixina B, os quais classificamos como sensíveis ou resistentes quando as CIMs forem  $\leq 2$  mg/L ou  $\geq 4$ mg/L, respectivamente (69, 70).

As polimixinas são consideradas o último recurso terapêutico frente às infecções originadas por microrganismos produtores de KPC e é a droga de escolha em muitas

instituições, porém estudos indicam que seu uso em monoterapia apresenta desfechos clínicos insatisfatórios (26, 46, 55, 68, 71). Em estudo retrospectivo realizado em 2013, a taxa de mortalidade entre pacientes que receberam apenas polimixina chegou a 57,5% (72). Isto posto, comumente a terapêutica aplicada em infecções por KP-KPC é estruturada associando-se polimixinas, carbapenêmicos, tigeciclina e/ou aminoglicosídeos (73). Estudos mostram que tratamentos combinados, que envolvam pelo menos duas drogas como carbapenêmicos, gentamicina, polimixina e tigeciclina, tem sido associados a um efeito sinérgico e menores taxas de resistência, apesar de ainda não existir um regime ótimo definido (48, 74-76).

A possibilidade de sinergismo entre polimixinas e outros antimicrobianos tem sido um dos racionais para a terapia combinada. O sinergismo entre polimixinas e meropenem frente a isolados de *K. pneumoniae* já foi relatado em alguns estudos, que puderam demonstrar um aumento na potência e no tempo da ação bactericida quando comparada a outras combinações, e uma diminuição na emergência de resistência a estes antibióticos ao longo do tratamento (46, 73).

Eleman *et al* demonstraram atividade sinérgica *in vitro* entre PMB e tigeciclina sobre 12 isolados clínicos de KP-KPC com CIMs  $\geq 16$  mg/L para PMB, tendo ocorrido redução das CIMs para as duas drogas e assim propondo uma possível associação efetiva (71). Porém, apesar do grande potencial destas terapias combinadas, que já são implementadas na rotina clínica em função da escassez de opções na terapia de KP-KPC, mais estudos são necessários para a padronização do tratamento destas infecções graves (71, 77).

Ao longo dos últimos anos as taxas de susceptibilidade as polimixinas decaíram, emergindo relatos de casos de resistência a estas drogas. Na região endêmica da Grécia, Kontopidou *et al* reportaram 20% de resistência a colistina em amostras de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos (78), um contexto epidemiológico mais favorável do que o cenário italiano, onde Monaco *et al* avaliaram 178 KP-KPC isoladas de UCI, e detectaram 43% de resistência (79). No Brasil, em 2015, Bartolleti *et al* apresentaram uma taxa de resistência a PMB de 27,1,8%, entre isolados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos (42). Em outra avaliação brasileira de 224 amostras de bacteremias por *K. pneumoniae*, realizada por Braun *et al* neste ano, 36 (16,1%) eram resistentes a polimixina B, reforçando o atual cenário de aumento dos índices de resistência as polimixinas (80).

### 1.3.4.2 Aminoglicosídeos

Aminoglicosídeos (usualmente amicacina e gentamicina) apresentam atividade *in vitro* sobre cerca de 50% das *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos, mas são poucos os estudos indicando seu uso em monoterapia no tratamento de infecções severas por bactérias Gram negativas (62, 81). Em estudo retrospectivo de Shields *et al*, realizado em 2016, a taxa de sobrevivência em 30 dias frente a infecções de corrente sanguínea por KP resistente aos carbapenêmicos foi de 70% (23/33 pacientes), quando aplicada a terapia com aminoglicosídeos (62).

Atualmente, os pontos de corte para interpretação da atividade *in vitro* de amicacina e gentamicina estão sendo questionados, e a padronização dos critérios de leitura entre os diferentes comitês faz-se necessária, devido à importância clínica desta classe de antimicrobianos. Segundo o CLSI, são considerados resultados sensíveis, intermediários e resistentes quando relatadas CIMs de  $\leq 16$  mg/L, 32 mg/L e  $\geq 64$  mg/L para amicacina, respectivamente, e CIMs de  $\leq 4$  mg/L, 8 mg/L e  $\geq 16$  mg/L para gentamicina (69). Já o EUCAST propõe pontos de corte mais restritivos, com CIMs de  $\leq 8$  mg/L, 16 mg/L e  $\geq 32$  mg/L considerados resultados sensíveis, intermediários e resistentes, respectivamente, para amicacina, e CIMs de  $\leq 2$  mg/L, 4 mg/L e  $\geq 8$  mg/L para gentamicina (70). Outro comitê americano, o USCAST, ainda considerou CIMs mais baixas para aminoglicosídeos sensíveis ou resistentes:  $\leq 4$  mg/L e  $\geq 8$  mg/L para amicacina, respectivamente, e CIMs de  $\leq 2$  mg/L e  $\geq 4$  mg/L para gentamicina, respectivamente (82). Visto que os comitês estabelecem pontos de corte clínicos diferentes, os isolados reportados como sensíveis podem expressar diferentes fenótipos, ressaltando a importância do conhecimento das CIMs para esta classe de antimicrobianos (81).

O tratamento com aminoglicosídeos em monoterapia é considerado mais apropriado em casos de infecções urinárias por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC), mas seu uso em terapias combinadas tem apresentado efeitos sinérgicos bactericidas em bacteremias (4, 62, 63, 83, 84). Quando demonstrada sensibilidade *in vitro*, aminoglicosídeos costumam ser associados ao tratamento de KP-KPC (85). Tratamentos combinados com gentamicina foram associados à redução de mortalidade em pacientes sépticos, durante um surto de *K. pneumoniae* resistentes a

carbapenêmicos e à colistina (62). Tang *et al* avaliaram 36 *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e encontraram taxas de 94,4% de sensibilidade à amicacina (segundo CLSI) e resultados sinérgicos quando testada a combinação de aminoglicosídeos e tigeciclina ou colistina frente a produtores de KPC (86).

No Brasil, Braun *et al* avaliaram 224 KP isoladas de sangue, e amicacina demonstrou maior sensibilidade (55,6%) entre os isolados sensíveis à PMB e, em contraste, gentamicina apresentou-se mais ativa (58,3%) frente os isolados resistentes (80).

### 1.3.4.2.3 Tigeciclina

Apesar da tigeciclina apresentar susceptibilidade *in vitro*, a sua aplicação em monoterapia já foi bastante relacionada com o aumento dos índices de mortalidade (64, 65). O seu uso no tratamento de bacteremias ainda é controverso, pelo fato de não atingir níveis séricos adequados com a dosagem padrão (87), porém existem algumas evidências que indicam dosagens *off-label* de tigeciclina em infecções por germes multirresistentes (55, 65). Tigeciclina combinada com gentamicina e doripenem demonstrou boa atividade no tratamento de infecções por KP-KPC em paciente sem comorbidades hospitalizados em unidades de cuidados intensivos (86).

Para a tigeciclina também são encontradas informações discordantes quanto aos pontos de corte clínicos. O documento do CLSI não possui nenhum ponto de corte, o EUCAST propõe as CIMs de  $\leq 1$ mg/L, 2mg/L e  $> 4$ mg/L na determinação de isolados sensíveis, intermediários e resistentes, respectivamente, e a bula para tigeciclina fornecida pelo FDA descreve as CIMs de  $\leq 2$ mg/L, 4mg/L e  $\geq 8$ mg/L, para sensíveis, intermediários e resistentes, respectivamente.

Em 2015, estudos *in vitro* realizados com uma coleção européia de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERCs) demonstraram sensibilidade frente a tigeciclina, com uma taxa de 17% de resistência em cepas de *K.pneumoniae* (88). Em 2015, He *et al* avaliaram o perfil de susceptibilidade a tigeciclina de 215 KP-KPC (baseando seus pontos de corte no EUCAST), relatando 11,2% de resistência e uma variação de CIM de 0,25–8mg/L. Se consideradas as recomendações para tigeciclina propostas pelo FDA, que define a resistência quando CIMs  $\geq 8$  mg/L, essa taxa de resistência seria menor, de 4,7% (89). O programa SENTRY também avaliou o

perfil de susceptibilidade de amostras clínicas da América Latina no período de 2011 a 2014. Foram coletadas 4543 enterobactérias, onde 98,3% dos isolados foram considerados sensíveis de acordo com o FDA ( $\leq 2$  mg/L) e 94,2% segundo as recomendações do EUCAST ( $\leq 1$  mg/L) (90).

No Brasil, Braun *et al*(2017) verificaram índices de sensibilidade de tigeciclina próximos, de 88,9% frente a isolados *K. pneumoniae* sensíveis à polimixina B e de 52,8% em relação as amostras resistentes à polimixina (80). Tigeciclina também foi um dos antimicrobianos mais ativos frente a isolados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos e polimixinas e isolados resistentes apenas a carbapenêmicos (69,4% e 72,2%, respectivamente) no estudo de Bartoletti *et al* (42).

#### 1.3.4.2.4 Carbapenêmicos

Isolados de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases geralmente possuem CIMs elevadas para carbapenêmicos, porém, na rotina laboratorial ainda é possível encontrar CIMs  $\leq 8$  mg/L, possibilitando a aplicação dos carbapenêmicos no tratamento destas infecções.

Uma grande variação das CIMs para carbapenêmicos em KP-KPC tem sido encontrada de acordo com a região geográfica em estudo e o tipo de carbapenemase produzido. Enquanto um estudo chinês com 95 isolados KP-KPC apresentou todas as CIM maiores do que 3 mg/L, uma coleção americana de 42 amostras teve CIMs  $\leq 2$  mg/L em 21% dos isolados testados, e na região endêmica da Grécia, de 150 amostras testadas, 32% permaneceram abaixo de  $\leq 2$  mg/L (65, 91). Ainda na Grécia, Kontopidou *et al*(2014) analisaram 127 *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos de 19 unidades de cuidados intensivos distribuídos pelo país, as quais apresentaram CIMs entre 1 e  $\leq 32$  mg/L, com ambas MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> de 32 mg/L (78).

Os índices de susceptibilidade de isolados de KP-KPC aos carbapenêmicos também podem variar de acordo com o ponto de corte utilizado, pois para CLSI são considerados sensíveis, intermediários e resistentes os isolados apresentando CIMs  $\leq 1$  mg/L, 2 mg/L e  $\geq 4$  mg/L, respectivamente, e para o EUCAST  $\leq 2$ mg/L, 4 a 8 mg/L e  $\geq 16$  mg/L, respectivamente (69, 70, 91).

Daikos *et al* avaliaram 44 casos de pacientes infectados por *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases e que receberam carbapenêmicos em monoterapia,

observando que o sucesso terapêutico aumentava conforme a CIM decrescia, obtendo taxas de 69% de eficácia quando as CIMs eram  $\leq 4$  mg/L (91). Gomez-Simmonds *et al*(2016) relataram resultados semelhantes em pacientes infectados por *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos tratados com regimes que incluíam estas drogas, demonstrando taxas de sucesso terapêutico de 87% quando a CIM para meropenem era  $\leq 4$  mg/L e de 67% com CIMs  $\geq 8$  mg/L (76). Porém, seu uso em monoterapia apresenta maiores índices de falha no tratamento quando comparados à sua associação com outras drogas (60% e 26%, respectivamente) (85).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Considerando que as infecções por KP-KPC têm incidência muito elevada em hospitais brasileiros de grande porte e que os estudos avaliando o perfil de suscetibilidade dessas bactérias, tanto à polimixina B, como a agentes alternativos,

ainda são escassos, sobretudo em isolados de infecção de corrente sanguínea, entendemos ser necessária a realização de uma avaliação em uma amostra selecionada em mais de uma instituição. Como existem diferentes pontos de corte para alguns desses agentes, uma caracterização mais aprofundada através da determinação das CIMs para os antimicrobianos de interesse também se faz necessária. Além disso, essa caracterização ajuda a entender com mais profundidade o perfil da epidemiologia da suscetibilidade em KP-KPC. Finalmente, a análise molecular complementa a investigação epidemiológica fornecendo subsídios para a compreensão da epidemiologia desses microrganismos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar o perfil fenotípico e clonal de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC, originárias de corrente sanguínea.



### 3.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) à polimixina B, meropenem e tigeciclina dos isolados de *K.pneumoniae* produtores de KPC;
- 2) Determinar as CIM à gentamicina e amicacina, dos isolados caracterizados como sensíveis a estes antimicrobianos pelo método de disco-difusão;
- 3) Determinar os perfis de susceptibilidade dos isolados frente à doxiciclina, sulfametoxazol-trimetoprima, ciprofloxacino e cloranfenicol por método de disco-difusão;
- 4) Analisar a relação clonal das amostras resistentes à polimixina B

### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella spp.* as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. Clin Microbiol Rev. 1998. p. 589-603.
2. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiol Mol Biol Rev. 2016;80(3):629-61.

3. Moradigaravand D, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. In: Chiller T, editor. mBio. 8. 1752 N St., N.W., Washington, DC2017.
4. Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(10):5873-84.
5. Ramos PI, Picao RC, Almeida LG, Lima NC, Girardello R, Vivan AC, *et al.* Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. BMC Genomics. 2014;15:54.
6. Goncalves GB, Furlan JPR, Vespero EC, Pelisson M, Stehling EG, Pitondo-Silva A. Spread of multidrug-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones in a tertiary hospital from southern Brazil. Infect Genet Evol. 2017;56:1-7.
7. Martin RM, Cao J, Brisse S, Passet V, Wu W, Zhao L, *et al.* Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. mSphere. 2016;1(5).
8. DeLeo FR, Kobayashi SD, Porter AR, Freedman B, Dorward DW, Chen L, *et al.* Survival of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 258 in Human Blood. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(4).
9. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. Clin Microbiol Rev. 2012;25(4):682-707.
10. Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. Microbiol Spectr. 2016;4(1).
11. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;73(4):354-60.
12. Meatherall BL, Gregson D, Ross T, Pitout JD, Laupland KB. Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. Am J Med. 2009;122(9):866-73.
13. Kang CK, Kim ES, Song KH, Kim HB, Kim TS, Kim NH, *et al.* Can a routine follow-up blood culture be justified in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia? A retrospective case-control study. BMC Infect Dis. 2013;13:365.
14. Chetcuti Zammit S, Azzopardi N, Sant J. Mortality risk score for *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. Eur J Intern Med. 2014;25(6):571-6.
15. Quan J, Zhao D, Liu L, Chen Y, Zhou J, Jiang Y, *et al.* High prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in community-onset bloodstream infections in China. J Antimicrob Chemother. 2017;72(1):273-80.
16. Bowers JR, Kitchel B, Driebe EM, MacCannell DR, Roe C, Lemmer D, *et al.* Genomic Analysis of the Emergence and Rapid Global Dissemination of the Clonal Group 258 *Klebsiella pneumoniae* Pandemic. PLoS One. 2015;10(7):e0133727.
17. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, *et al.* International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. Jama. 2009;302(21):2323-9.
18. ANVISA. Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM. Boletim Informativo: Segurança do Paciente e Qualidade em Serviço de Saúde nº12. Relatório da resistência microbiana em infecções primárias de corrente sanguínea confirmadas laboratorialmente relacionadas ao uso de cateter venoso central em unidades de terapia intensiva

- (2014). <http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/12>. Acessado em 06 de outubro de 2017. 2015.
19. Jones RN, Marshall SA. Antimicrobial activity of cefepime tested against Bush group I beta-lactamase-producing strains resistant to ceftazidime. A multilaboratory national and international clinical isolate study. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1994;19(1):33-8.
  20. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect*. 2009;73(4):345-54.
  21. Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Lab Med*. 2017;37(2):303-15.
  22. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. *N Engl J Med*. 2005;352(4):380-91.
  23. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and Prevention. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;53(1):60-7.
  24. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(4):228-36.
  25. Carvalhaes CG, Cayo R, Gales AC. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the intensive care unit: a real challenge to physicians, scientific community, and society. *Shock*. 2013;39 Suppl 1:32-7.
  26. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, *et al*. Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(4):1151-61.
  27. Potter RF, D'Souza AW, Dantas G. The rapid spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Drug Resist Updat*. 2016;29:30-46.
  28. Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. Deaths attributable to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(7):1170-5.
  29. Castanheira M, Mendes RE, Woosley LN, Jones RN. Trends in carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from Europe and the Americas: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2007-09). *J Antimicrob Chemother*. 66. England2011. p. 1409-11.
  30. Deleo FR, Chen L, Porcella SF, Martens CA, Kobayashi SD, Porter AR, *et al*. Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(13):4988-93.
  31. Campos AC, Albiero J, Ecker AB, Kuroda CM, Meirelles LE, Polato A, *et al*. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing K pneumoniae: A systematic review. *Am J Infect Control*. 2016;44(11):1374-80.
  32. Girometti N, Lewis RE, Giannella M, Ambretti S, Bartoletti M, Tedeschi S, *et al*. *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infection: Epidemiology and Impact of Inappropriate Empirical Therapy. *Medicine (Baltimore)*. 2014;93(17).
  33. Sampaio JL, Gales AC. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on  $\beta$ -lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol*. 2016;47 Suppl 1:31-7.
  34. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 2006;53:333-4.
  35. Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 53. United States2009. p. 2702.

36. Fehlberg LC, Carvalho AM, Campana EH, Gontijo-Filho PP, Gales AC. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraiba, Northeastern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2012;16(6):577-80.
37. Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(2):265-8.
38. Chang MR, Biberg CA, Lopes FA, Tetila AF, Pignatari AC. The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the bla(kpc) gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(1):114-5.
39. Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR, Barin J, Darini AL, Zavascki AP, *et al*. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 11):1721-7.
40. Zavascki AP, Zoccoli CM, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, *et al*. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting? *Int J Infect Dis*. 14. Canada2010. p. e539-40.
41. Tuon FF, Rocha JL, Toledo P, Arend LN, Dias CH, Leite TM, *et al*. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Braz J Infect Dis*. 2012;16(5):416-9.
42. Bartolleti F, Seco BM, Capuzzo Dos Santos C, Felipe CB, Lemo ME, Alves TaS, *et al*. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(10):1849-51.
43. Seibert G, Horner R, Meneghetti BH, Righi RA, Dal Forno NL, Salla A. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. *Einstein (Sao Paulo)*. 2014;12(3):282-6.
44. Arend LN, Pilonetto M, Siebra Cde A, Tuon FF. Phenotypic and molecular characterization of 942 carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) in southern Brazil. *J Infect Chemother*. 2015;21(4):316-8.
45. Diep JK, Jacobs DM, Sharma R, Covelli J, Bowers DR, Russo TA, *et al*. Polymyxin B in Combination with Rifampin and Meropenem against Polymyxin B-Resistant KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(2).
46. Hendrik TC, Voor In 't Holt AF, Vos MC. Clinical and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella* spp.: A Systematic Review and Meta-Analyses. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140754.
47. Camargo JF, Simkins J, Beduschi T, Tekin A, Aragon L, Perez-Cardona A, *et al*. Successful Treatment of Carbapenemase-Producing Pandrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):5903-8.
48. Ben-David D, Kordevani R, Keller N, Tal I, Marzel A, Gal-Mor O, *et al*. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(1):54-60.
49. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol*. 2014;22(12):686-96.
50. Peirano G, Bradford PA, Kazmierczak KM, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JD. Importance of Clonal Complex 258 and IncFK2-like Plasmids among a Global Collection of *Klebsiella pneumoniae* with blaKPC. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(4).
51. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Climaco EC, Martinez R, *et al*. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among

- Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3579-83.
52. Andrade LN, Vitali L, Gaspar GG, Bellissimo-Rodrigues F, Martinez R, Darini AL. Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. *J Clin Microbiol.* 2014;52(7):2530-5.
53. Arend LN, Toledo P, Pilonetto M, Tuon FF. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in different facilities in Southern Brazil. *American Journal of Infection Control.* 2015;43(2):137-40.
54. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(6):1119-25.
55. Zavascki AP, Bulitta JB, Landersdorfer CB. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(12):1333-53.
56. Vardakas KZ, Falagas ME. Colistin versus polymyxin B for the treatment of patients with multidrug-resistant Gram-negative infections: a systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;49(2):233-8.
57. Zavascki AP, Nation RL. Nephrotoxicity of Polymyxins: Is There Any Difference between Colistimethate and Polymyxin B? *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(3).
58. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol.* 2013;8(6):711-24.
59. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(6):1206-15.
60. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(2):557-96.
61. Shields RK, Clancy CJ, Press EG, Nguyen MH. Aminoglycosides for Treatment of Bacteremia Due to Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(5):3187-92.
62. Molina J, Cordero E, Palomino J, Pachon J. [Aminoglycosides and polymyxins]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(3):178-88.
63. Xie J, Roberts JA, Alobaid AS, Roger C, Wang Y, Yang Q, *et al.* Population pharmacokinetics of tigecycline in critically ill patients with severe infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017.
64. Thaden JT, Pogue JM, Kaye KS. Role of newer and re-emerging older agents in the treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Virulence.* 2017;8(4):403-16.
65. - Tigecycline: an update. - *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* (-4):- 331.
66. El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem.* 2017;131:185-95.
67. Sharma R, Patel S, Abboud C, Diep J, Ly NS, Pogue JM, *et al.* Polymyxin B in combination with meropenem against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: pharmacodynamics and morphological changes. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;49(2):224-32.

68. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017.
69. EUCAST. EUCAST clinical MIC breakpoints. [www.eucast.org](http://www.eucast.org) , accessed 02 September 2017. . 2017.
70. Elemam A, Rahimian J, Doymaz M. In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2010;48(10):3558-62.
71. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, *et al*. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(4):2108-13.
72. Zusman O, Avni T, Leibovici L, Adler A, Friberg L, Stergiopoulou T, *et al*. Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(10):5104-11.
73. Souli M, Karaiskos I, Masgala A, Galani L, Barmpouti E, Giamarellou H. Double-carbapenem combination as salvage therapy for untreatable infections by KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017;36(7):1305-15.
74. Papadimitriou-Olivgeris M, Fligou F, Bartzavali C, Zotou A, Spyropoulou A, Koutsileou K, *et al*. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection in critically ill patients: risk factors and predictors of mortality. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017;36(7):1125-31.
75. Gomez-Simmonds A, Nelson B, Eiras DP, Loo A, Jenkins SG, Whittier S, *et al*. Combination Regimens for Treatment of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infections. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(6):3601-7.
76. Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. Clin Microbiol Rev. 2012;25(3):450-70.
77. Kontopidou F, Giamarellou H, Katerelos P, Maragos A, Kioumis I, Trikka-Graphakos E, *et al*. Infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among patients in intensive care units in Greece: a multi-centre study on clinical outcome and therapeutic options. Clin Microbiol Infect. 2014;20(2):O117-23.
78. Monaco M, Giani T, Raffone M, Arena F, Garcia-Fernandez A, Pollini S, *et al*. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. Euro Surveill. 2014;19(42).
79. Zavascki AP, Klee BO, Bulitta JB. Aminoglycosides against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in the critically ill: the pitfalls of aminoglycoside susceptibility. Expert Rev Anti Infect Ther. 2017;15(6):519-26.
80. Morrill HJ, Pogue JM, Kaye KS, LaPlante KL. Treatment Options for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. Open Forum Infectious Diseases. 2015;2(2):ofv050.
81. Vidal L, Gafter-Gvili A, Borok S, Fraser A, Leibovici L, Paul M. Efficacy and safety of aminoglycoside monotherapy: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. J Antimicrob Chemother. 2007;60(2):247-57.
82. Lee GC, Burgess DS. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2012;11:32.
83. Tang HJ, Lai CC, Chen CC, Zhang CC, Weng TC, Chiu YH, *et al*. Colistin-sparing regimens against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing K.

- pneumoniae isolates: Combination of tigecycline or doxycycline and gentamicin or amikacin. *J Microbiol Immunol Infect.* 2016.
84. Braun G, Cayo R, Matos AP, Fonseca JM, Gales AC. Temporal evolution of polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones recovered from blood cultures in a teaching hospital during a 7-year period. *Int J Antimicrob Agents.* 2017.
85. Wang J, Pan Y, Shen J, Xu Y. The efficacy and safety of tigecycline for the treatment of bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017;16(1):24.
86. Livermore DMLCiataDMLEtaDM, MW, SM, MD, JZ, NW. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomicin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. - *International Journal of Antimicrobial Agents.* (- 5):- 415.
87. He F, Fu Y, Chen Q, Ruan Z, Hua X, Zhou H, *et al.* Tigecycline susceptibility and the role of efflux pumps in tigecycline resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One.* 2015;10(3):e0119064.
88. Sader HS, Castanheira M, Farrell DJ, Flamm RK, Mendes RE, Jones RN. Tigecycline antimicrobial activity tested against clinical bacteria from Latin American medical centres: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2011-2014). *Int J Antimicrob Agents.* 2016;48(2):144-50.
89. Daikos GL, Markogiannakis A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(8):1135-41.

**Article title:** KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from Brazilian hospitals: what (still) remain active?

**Authors:** Laura C. Antchevis<sup>a,b</sup>, Cibele M. Magagnin<sup>a,b</sup>, Taíse M. Goulart<sup>a</sup>, Amanda S. Martins<sup>a</sup>, Aline G. Nunes<sup>a</sup>, Alexandre P. Zavascki<sup>c,d</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil;

<sup>b</sup>Laboratório Weinmann – Grupo Fleury, Porto Alegre, Brazil;

<sup>c</sup>Department of Internal Medicine, Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>d</sup>Infectious Diseases Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

**Running Title:** KPC-producing *K. pneumoniae* from Brazil

**Keywords:** polymyxins; colistin; resistance; aminoglycoside; *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; tigecycline

# Corresponding Author: Alexandre P. Zavascki. Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil.  
Phone/fax: +55 (51) 33598152, e-mail: [azavascki@hcpa.edu.br](mailto:azavascki@hcpa.edu.br)

## **Abstract**

Nowadays, bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (KPC-KP) represent a major threat to public health in the world. Especially in Brazil, the lack of new therapeutic options and the increase rates of resistance to the remain available drugs promotes a substantial challenge on the treatment of these severe infections. From this scenario, our objective in this study was to assess the local epidemiology regarding KPC-KP and its susceptibility to available drugs. We assessed polymyxin B (PMB) resistance rates, the susceptibility profile of alternative antimicrobials, with focus on aminoglycosides and tigecycline (TGC), according to different breakpoints definitions and investigated the molecular epidemiology of PMB-resistant isolates. We could demonstrate a worrisome resistance rate to PMB in KPC-KP causing bloodstream infections (BSIs) in four Brazilian hospitals, as well as a high level of meropenem (MEM) resistant MICs. Alternative antimicrobials with highest *in vitro* activity were TGC and amikacin (AMK), even



though susceptibility rates importantly decrease using criteria with stricter breakpoints. Mostly of the PMB-resistant isolates showed multiclonal origin. These results appoint for a dramatic future regarding the treatment of KPC-KP bloodstream infections and new antimicrobial agents active against these isolates are urgently needed.

## 1. Introduction

Resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* mediated by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) represents one of the major health problems in the world [1]. In Brazil, after a sharp increase in KPC-KP incidence during the early 2010s, these organisms are now one of the major pathogens in hospital-acquired infections [1]. The clonal expansion of KPC-KP isolates belonging to CC258 has driven the dissemination in Brazil [2].

Worrisomely, resistance to polymyxins - the major therapeutic options against these isolates - among KPC-KP has reached alarming rates in Brazil [1, 3], similar to what has been observed in some European countries such as Greece and Italy [4, 5]. Indeed, very few options remain potentially active against polymyxins-resistant KPC-KP, including aminoglycosides and tigecycline. However, several issues regarding the susceptibility breakpoints for these antimicrobials are pending and clinical effectiveness of these agents has been questioned depending on the breakpoint used [6, 7].

In this study, we assessed PMB resistance rates among KPC-KP bloodstream isolates, addressed the susceptibility profile of alternative antimicrobials, with focus on aminoglycosides and tigecycline, according to different breakpoints definitions and investigated the molecular epidemiology of PMB-resistant isolates.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Bacterial Isolates

Bloodstream *K. pneumoniae* isolates with reduced susceptibility to meropenem, imipenem or ertapenem according to Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) were selected from four tertiary-care hospitals in Porto Alegre, Brazil, from April 2013 to April 2015. Isolates were identified by Vitek2®. The presence of bla<sub>NDM-1</sub>, bla<sub>KPC-2</sub>, bla<sub>VIM-type</sub>, bla<sub>GES-type</sub>, bla<sub>OXA-48-like</sub>, and bla<sub>IMP-type</sub> was assessed by multiplex high-resolution, melting, real-time PCR, as described previously by Monteiro *et al.*(8)

### 2.2. Susceptibility Tests

Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by broth microdilution (BMD) for PMB, MEM, TGC, and for the isolates reported susceptible to AMK and gentamicin (GEN) by disk-diffusion according to CLSI breakpoint. *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as quality controls. Disk-diffusion was also performed to address susceptibility to chloramphenicol (CHL), ciprofloxacin (CIP), sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT) and doxycycline (DOX). Susceptibility profiles was interpreted using CLSI [9], European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [10], United States Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (USCAST) [11] and Food and Drug Administration (FDA) [12], when available and applicable. The MIC distribution of MEM, TGC, AMK and GEN was compared between PMB-resistant and PMB-susceptible isolates through Wilcoxon Mann-Whitney test.

### 2.3. Molecular Typing

Clonal relatedness was assessed by DNA macrorestriction after XbaI digestion followed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Profiles were analyzed by BioNumerics 7.5 software (Applied Maths) applying the Dice similarity coefficient. Isolates presenting more than 80% of similarity were considered belonging to the same clonal group.

### 3. Results

#### 3.1. Polymyxin B MICs and susceptibility rates

A total of 158 KPC-producing *K. pneumoniae* were included in the study. Most (71 isolates, 44.9%) were obtained from hospital A, followed by hospital B (42, 26.6%), C (27, 17.1%) and D (18, 11.4%). The MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> for PMB were 0.25mg/L and 16mg/L, respectively, ranging from  $\leq 0.125$  to  $\geq 64$ mg/L (Figure 1S). Forty (25.3%) isolates were considered resistant to this antibiotic.

#### 3.2. Meropenem, tigecycline and aminoglycosides MICs and susceptibility rates

The MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> for MEM were 32mg/L and  $\geq 256$ mg/L, respectively, ranging from 4mg/L to  $\geq 256$ mg/L. . According to CLSI, none of the isolates were susceptible to MEM, but ten isolates could be reported as intermediate using EUCAST breakpoints (one with MIC=4mg/L and ten with MIC=8mg/L). MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> for TGC were 2mg/L and 8mg/L, respectively, ranging from 0.25 to  $\geq 16$ mg/L, resulting in 94 (59.5%) considered susceptible according to EUCAST and 137 (86.7%) according to Food and Drug Administration FDA breakpoint. MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> for AMK were 32mg/L and  $\geq 64$ mg/L, ranging from  $\leq 1$ mg/L to  $\geq 64$ mg/L, and the MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> for GEN were  $\geq 16$ mg/L and  $\geq 16$ mg/L, ranging from  $\leq 1$ mg/L to  $\geq 16$ mg/L. A total of 48 (30.4%), 28 (17.7%) and 16 (10.1%) were considered susceptible to AMK according to CLSI, EUCAST and USCAST, respectively, and 11 (7.0%), 9 (5.7%) and 9 (5.7%) were

considered susceptible to GEN according to CLSI, EUCAST and USCAST, respectively. The MIC distribution of MEM, TGC, AMK and GEN were not significantly different between PMB-resistant and PMB-susceptible KPC-KP isolates (Figure 1);  $p=0.95$ ,  $p=0.50$ ,  $p=0.61$  and  $p=0.67$ , respectively.

### *3.3. Susceptibility rates to other antimicrobials*

Susceptibility rates to other antimicrobials tested by disk-diffusion and interpreted according to CLSI were higher for DOX (69 isolates, 43.7%) followed by CHL (26, 16.4%), SXT (10, 6.3%) and CIP (7, 4.4%). According to EUCAST, these rates change for CHL (35, 22.1%), SXT (12, 7.6%) and CIP (5, 3.2%). The same rates were observed according to USCAST and neither EUCAST nor USCAST have breakpoints for doxycycline.

### *3.4. Polymyxin B-resistant KPC-producing K. pneumoniae*

The antimicrobial susceptibility profile for 40 PMB-resistant KPC-KP isolates, according to different regulatory committees are shown in Table 1.

A sample of (72.5%) of the 40 PMB-resistant isolates were randomly selected for molecular typing, which shown 18 distinct clonal profiles, of which Five clones were identified in hospital A, nine in hospital B, seven in C and two in D (Figure 1). A total of five clones were identified in more than one hospital (Figure 2S).

## **4. Discussion**

In this study we could demonstrate a worrisome resistance rate to PMB in KPC-KP causing (BSIs) in four Brazilian hospitals. We also showed that the choice of optimal

therapy for these resistant isolates is a huge challenge and resistance rates to major alternative agents are importantly affected by different breakpoints.

First, it is noteworthy the finding the great majority of KPC-KP isolates presented high-level resistance to meropenem. In fact, only ten (6.3%) isolates presented a MIC  $\leq 8$ mg/L, which is associated with improved clinical outcomes when meropenem is used in combination with polymyxins [13, 14]. Although emerging data suggest that high doses of meropenem may be beneficial even against isolates with MIC higher than 8mg/L [15], pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) data indicates a much higher probability of target attainment against isolates with MICs lower than 8mg/L, and very low probabilities with MICs higher than 32mg/L, as are most of isolates evaluated in our study [16], unless administered as high-dose continuous infusion regimes [17, 18].

An elevated proportion of high-level resistance to PMB was also observed in the 40 PMB-resistant isolates; in fact, only 6 isolates had a MIC=4mg/L, which could occasionally present a MIC=2mg/L considering methodological variation of BMD. In other words, it means that PMB is of limited use for these isolates because PK/PD targets are very unlikely attained even when the MIC is 4mg/L either with PMB or colistin, especially with the narrow therapeutic window of polymyxins [19, 20].

Our study also demonstrated that the scenario of alternative agents is much far from ideal. First because a relatively high proportion of “susceptibility” (86.7%) was only found for TGC using the FDA breakpoint. However, the use of TGC in monotherapy for bloodstream infections is not recommended because of low serum levels, especially against isolates with MICs=2mg/L since most patients will only reach mean steady-state serum concentrations below this value even if a higher dose (100mg every 12 hours) is administered [21]. Although the TGC MICs distribution was similar between PMB-

resistant and susceptible isolates, the susceptibility rates were lower among the former, with only 32.5% of isolates considered susceptible (i.e. MIC $\leq$ 1mg/L) according to EUCAST.

In addition, even considering the CLSI breakpoints for aminoglycosides, susceptibility to AMK, the most active aminoglycoside in our isolates, was only 30.4%. Notably, this rate dropped to only 17.7% and 10.1% using EUCAST and USCAST susceptibility breakpoints, which seems to be more appropriate considering the PK/PD of AMK [6]. Furthermore, the use of these aminoglycosides in monotherapy for KPC-KP bloodstream infections has been scarcely reported and clinical outcomes remain largely unknown [22]. Similar susceptibility rates were found among PMB-resistant isolates.

Susceptibility rates to alternative agents among carbapenem-resistant *Klebsiella* spp., including KPC-KP isolates, have been varied in different studies with these organisms, with small modifications across distinct geographic areas [1, 23-26]. However, our study showed that these rates can importantly change for TGC and AMK, which are among the most *in vitro* active antimicrobials among several of these studies, according to the criteria used for interpretation.

The finding of several clonally unrelated isolates among the PMB-resistant isolates indicates that selective pressure exerted by PMB exposure is likely associated with *de novo* resistance emergence in these isolates. Although we have not investigated the resistance mechanisms of PMB resistance in our isolates, *mcr-1* gene has been only rarely found in KPC-KP from Brazil [1, 3, 27]. However, the horizontal transmission still plays some role in the dissemination of PMB-resistant KPC-KP, since the clones have been found in more than one hospital included in our study.

In conclusion, our study showed worrisomely elevated rates of PMB-resistant KPC-KP bloodstream infections in four Brazilian hospitals, mostly of multiclonal origin. Alternative antimicrobials with highest *in vitro* activity were TGC and AMK, even though susceptibility rates importantly decrease using criteria with stricter breakpoints, such as EUCAST and USCAST, which seems to be more adequate from a PK/PD perspective. PMB-resistant KPC-KP isolates causing bloodstream infections are a major threat since therapeutic alternative are scarce. New antimicrobial agents active against these isolates are urgently needed.

### **Acknowledgements**

*Funding:* This study was supported by “Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (15-0630).

*Competing interests:* A. P. Z. is a research fellow of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology, Brazil . A. P. Z. has received honoraria for speaking engagements and consultancy from AstraZeneca, Cipla, MSD, Pfizer and United Pharmaceuticals. All other authors: none to declare.

*Ethical approval:* The local ethics committee of each hospital approved the study (15-0630).

### **References**

- [1] Bartolleti F, Seco BM, Capuzzo Dos Santos C, Felipe CB, Lemo ME, Alves TaS, *et al.* Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(10):1849-51.
- [2] Peirano G, Bradford PA, Kazmierczak KM, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JD. Importance of Clonal Complex 258 and IncFK2-like Plasmids among a Global

Collection of *Klebsiella pneumoniae* with blaKPC. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(4).

[3] Braun G, Cayo R, Matos AP, Fonseca JM, Gales AC. Temporal evolution of polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones recovered from blood cultures in a teaching hospital during a 7-year period. Int J Antimicrob Agents. 2017.

[4] Kontopidou F, Giamarellou H, Katerelos P, Maragos A, Kioumis I, Trikka-Graphakos E, *et al.* Infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among patients in intensive care units in Greece: a multi-centre study on clinical outcome and therapeutic options. Clin Microbiol Infect. 2014;20(2):O117-23.

[5] Monaco M, Giani T, Raffone M, Arena F, Garcia-Fernandez A, Pollini S, *et al.* Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. Euro Surveill. 2014;19(42).

[6] Zavascki AP, Klee BO, Bulitta JB. Aminoglycosides against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in the critically ill: the pitfalls of aminoglycoside susceptibility. Expert Rev Anti Infect Ther. 2017;15(6):519-26.

[7] Dixit D, Madduri RP, Sharma R. The role of tigecycline in the treatment of infections in light of the new black box warning. Expert Rev Anti Infect Ther. 2014;12(4):397-400.

[8] Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother. 2012;67(4):906-9.

[9] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017.

[10] EUCAST. EUCAST clinical MIC breakpoints. [www.eucast.org](http://www.eucast.org), accessed 02 September 2017. 2017.

[11] USCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (v3.0). <http://www.uscast.org>, accessed 02 September. 2017.

[12] FDA Approved Drug Products. Prescribe information of tigecycline. [www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2016/021821s039lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/021821s039lbl.pdf), accessed 2 September, 2017. 2016.

[13] Daikos GL, Tsaousi S, Tzouveleakis LS, Anyfantis I, Psychogiou M, Argyropoulou A, *et al.* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(4):2322-8.

[14] Tumbarello M, Treccarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Giacobbe DR, Bassetti M, *et al.* Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. J Antimicrob Chemother. 2015;70(7):2133-43.

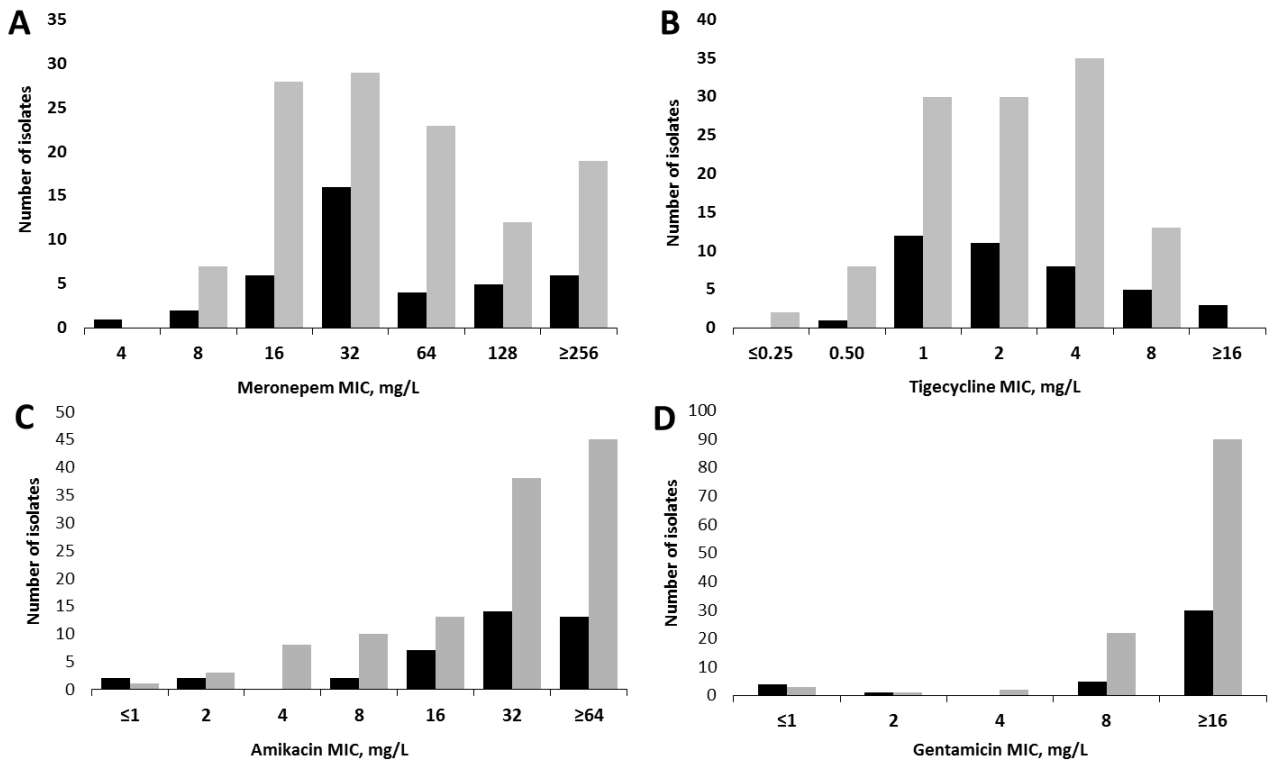
[15] Giannella M, Treccarichi EM, Giacobbe DR, De FG, Bassetti M, Bartoloni A, *et al.* Effect of combination therapy containing a high dose carbapenem on mortality in patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. Int J Antimicrob Agents. 2017.

[16] Mattioli F, Fucile C, Del Bono V, Marini V, Parisini A, Molin A, *et al.* Population pharmacokinetics and probability of target attainment of meropenem in critically ill patients. Eur J Clin Pharmacol. 2016;72(7):839-48.

[17] Cojutti P, Sartor A, Righi E, Scarparo C, Bassetti M, Pea F. Population Pharmacokinetics of High-Dose Continuous-Infusion Meropenem and Considerations for Use in the Treatment of Infections Due to KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(10).



- [18] Pea F, Della Siega P, Cojutti P, Sartor A, Crapis M, Scarparo C, *et al.* Might real-time pharmacokinetic/pharmacodynamic optimisation of high-dose continuous-infusion meropenem improve clinical cure in infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*? *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49(2):255-8.
- [19] Sandri AM, Landersdorfer CB, Jacob J, Boniatti MM, Dalarosa MG, Falci DR, *et al.* Population pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients: implications for selection of dosage regimens. *Clin Infect Dis*. 2013;57(4):524-31.
- [20] Tran TB, Velkov T, Nation RL, Forrest A, Tsuji BT, Bergen PJ, *et al.* Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet? *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(6):592-7.
- [21] Xie J, Roberts JA, Alobaid AS, Roger C, Wang Y, Yang Q, *et al.* Population pharmacokinetics of tigecycline in critically ill patients with severe infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017.
- [22] Shields RK, Clancy CJ, Press EG, Nguyen MH. Aminoglycosides for Treatment of Bacteremia Due to Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(5):3187-92.
- [23] Livermore DML, Ciata DM, Lett DM, MW, SM, MD, JZ, NW. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. - *International Journal of Antimicrobial Agents*. (- 5):- 415.
- [24] Chen A, Smith KP, Whitfield BA, Zucchi PC, Lasco TM, Bias TE, *et al.* Activity of minocycline against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates, with comparison to doxycycline and tigecycline. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2017;88(4):365-7.
- [25] Sader HS, Castanheira M, Farrell DJ, Flamm RK, Mendes RE, Jones RN. Tigecycline antimicrobial activity tested against clinical bacteria from Latin American medical centres: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2011-2014). *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(2):144-50.
- [26] Tang HJ, Lai CC, Chen CC, Zhang CC, Weng TC, Chiu YH, *et al.* Colistin-sparing regimens against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates: Combination of tigecycline or doxycycline and gentamicin or amikacin. *J Microbiol Immunol Infect*. 2016.
- [27] Dalmolin TV, Martins AF, Zavascki AP, de Lima-Morales D, Barth AL. Acquisition of the mcr-1 gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2017.



**Figure 1.** Minimal Inhibitory Concentrations of meropenem (MEM) (A), tigecycline (TGC) (B), amikacin (AMK) (C) and gentamicin (GEN) (D) in polymyxin B (PMB)-resistant (black columns) and PMB-susceptible (gray columns) KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection isolates. Broth microdilution for aminoglycosides were performed only in susceptible isolates by disk-diffusion according to CLSI breakpoints. Isolates classified as intermediate by disk-diffusion according to CLSI were assigned as having MICs of 32mg/L and 8mg/L for amikacin and gentamicin, respectively, and those classified as resistant by the same criteria as having MICs ≥64mg/L and ≥16mg/L, for these antibiotics, respectively.

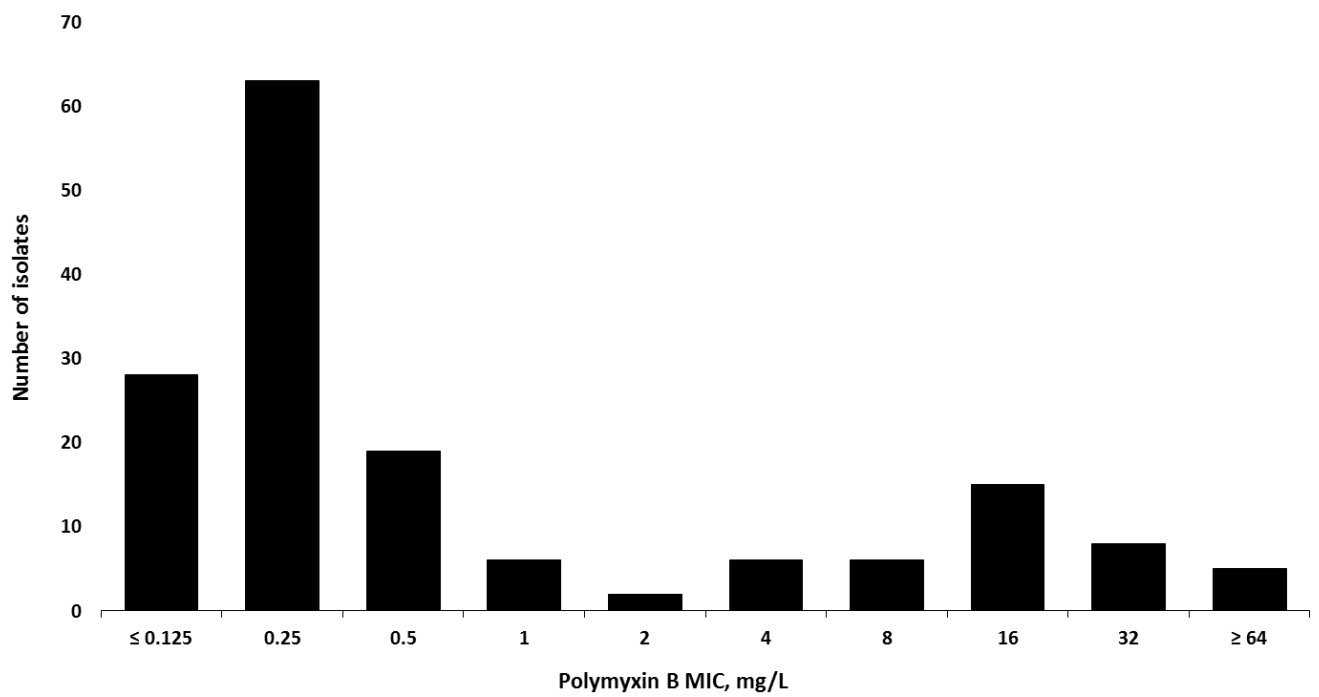


Figure 1S: Polymyxin B MIC distribution among 158 KPC-producing *K. pneumoniae*.

**Table 1. Susceptibility profile for the 40 polymyxin B (PMB)-resistant bloodstream KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates according to different regulatory committees.**

|                        |                   |                   |            | CLSI <sup>a</sup> | EUCAST <sup>b</sup> | USCAST <sup>c</sup> | FDA <sup>d</sup> |
|------------------------|-------------------|-------------------|------------|-------------------|---------------------|---------------------|------------------|
|                        | MIC <sub>50</sub> | MIC <sub>90</sub> | Range      | S (%)             | S (%)               | S (%)               | S (%)            |
| <b>PMB<sup>e</sup></b> | 16                | ≥ 64              | 4 - ≥ 64   | 0                 | 0                   | 0                   | 0                |
| <b>MEM<sup>e</sup></b> | 32                | ≥ 256             | 4 - ≥ 256  | 0                 | 0                   | 0                   | 0                |
| <b>TGC<sup>e</sup></b> | 2                 | 8                 | 0,5 - ≥ 16 | NA                | 13 (32.5)           | NA                  | 24 (60.0)        |
| <b>AMK<sup>e</sup></b> | 32                | ≥ 64              | 1 - ≥ 64   | 15 (37.5)         | 6 (15.0)            | 4 (10.0)            | NA               |
| <b>GEN<sup>e</sup></b> | ≥ 16              | ≥ 16              | 1 - ≥ 16   | 5 (12.5)          | 5 (12.5)            | 5 (12.5)            | NA               |
| <b>CHL<sup>f</sup></b> | NA                | NA                | NA         | 9 (22.5)          | 10 (25.0)           | NA                  | NA               |
| <b>CIP<sup>f</sup></b> | NA                | NA                | NA         | 2 (5.0)           | 2 (5.0)             | 2 (5.0)             | NA               |
| <b>SXT<sup>f</sup></b> | NA                | NA                | NA         | 4 (10.0)          | 4 (10.0)            | 4 (10.0)            | NA               |
| <b>DOX<sup>f</sup></b> | NA                | NA                | NA         | 24 (60.0)         | NA                  | NA                  | NA               |

PMB polymyxin B, MEM meropenem, TGC tigecycline, AMK amikacin, GEN gentamicin, CHL chloramphenicol, CIP ciprofloxacin, SXT, Sulfamethoxazole/Trimethoprim, DOX, doxycycline. NA Not Applicable. S sensibility.

<sup>a</sup> CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute, <sup>b</sup> EUCAST European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, <sup>c</sup> USCAST United States Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, <sup>d</sup> FDA Food and Drug Administration, <sup>e</sup> susceptible profile by broth microdilution, <sup>f</sup> susceptible profile by disk diffusion.

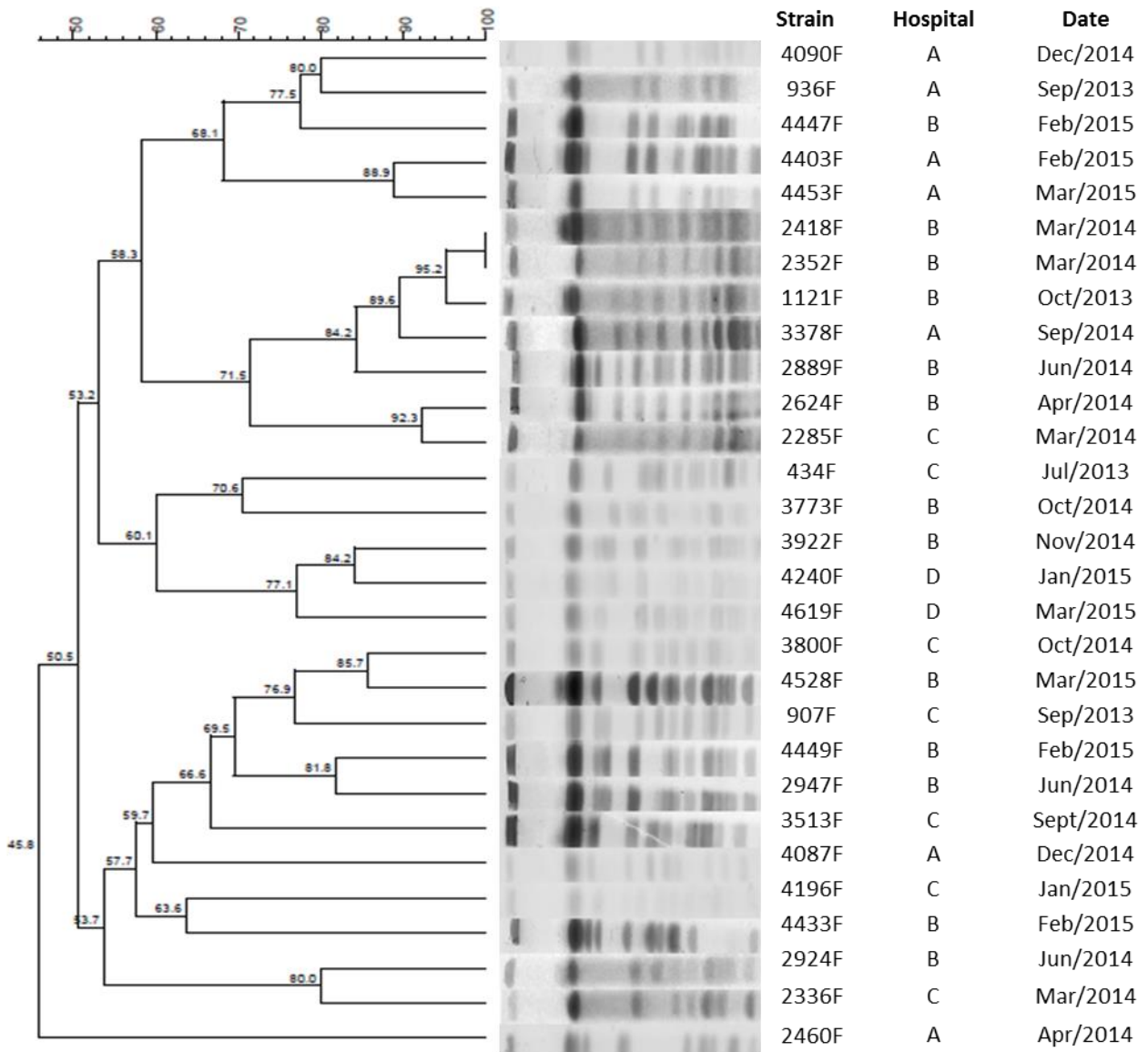


Figure 2S: Dendrogram, date and hospital (indicated by letters A to D) of PMB-resistant *K. pneumoniae* isolates.