



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA CAMPUS SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARTINAIR SANTANA DA SILVA

**PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA E DETECÇÃO DE GENES DE
RESISTÊNCIA EM CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE PACIENTES
ASSISTIDOS EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO DA REGIÃO NORTE DO CEARÁ**

SOBRAL

2024

MARTINAIR SANTANA DA SILVA

PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA E DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE PACIENTES ASSISTIDOS EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO DA REGIÃO NORTE DO CEARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Linha de Pesquisa: Biologia Molecular e de Microrganismos. Área de Concentração: Resistência Antimicrobiana.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa.

Coorientador: Prof. Dr. Patrick Veras Quelemes

SOBRAL

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Slp

SILVA, MARTINAIR SANTANA DA SILVA.
PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA E DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA
EM CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE PACIENTES ASSISTIDOS EM UM
HOSPITAL TERCIÁRIO DA REGIÃO NORTE DO CEARÁ / MARTINAIR SANTANA DA SILVA
SILVA. – 2024.

63 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde, Sobral, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa .

Coorientação: Prof. Dr. Patrick Veras Quelemes .

1. Carbapenemases. 2. IRAS. 3. Multirresistentes . 4. Resistência antimicrobiana. I. Título.

CDD 610

MARTINAIR SANTANA DA SÍLVA

PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA E DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE PACIENTES ASSISTIDOS EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO DA REGIÃO NORTE DO CEARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Linha de Pesquisa: Biologia Molecular e de Microrganismos. Área de Concentração: Resistência Antimicrobiana.

Aprovada em: 29/05/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Patrick Veras Quelemes (Coorientador)
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Profa. Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle (Examinadora)
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Profa. Dra. Virgínia Régia Souza da Silveira (Examinadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, aos meus pais Luíza e José Antônio,
minha irmã Markelane por sempre me
incentivar e apoiar em todos os momentos, e a
minha força de lutar diariamente meus filhos,
Welton Filho e Maria Luíza.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus e as entidades divinas pela sabedoria, força, discernimento e proteção em todos os momentos.

À minha família pela compreensão dos momentos ausentes, pela torcida e pelas palavras de força perante as dificuldades, sempre orando para meu sucesso. A Dona Diva, o Senhor Leopoldo e a meu esposo Welton, pelo amor e cuidado aos meus filhos nos momentos de distância, aos meus filhos que me fazem lutar pelos meus propósitos, aos meus pais pelos ensinamentos, e em especial a minha irmã Markelane por toda ajuda nesse percurso.

Ao meu orientador, Professor Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa por toda paciência e oportunidade de fazer parte do seu grupo de estudo, grata pelos ensinamentos, apoio, atenção e disponibilidade. Meu respeito e minha gratidão.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Patrick Veras Quelemes esse ser iluminado, por toda ajuda, positividade e disponibilidade de tempo durante os experimentos, minha admiração e gratidão eterna por tudo.

Aos Professores participantes da banca examinadora Profa. Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle, Dra. Virgínia Régia Souza da Silveira pela disponibilidade de tempo.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Ceará (UFC) *Campus* Sobral pela oportunidade e por me permitir colaborar com a produção científica desta estimada casa.

Ao Laboratório de Microbiologia e Parasitologia (LAMP) da Universidade Federal do Piauí, por ter permitido a realização de uma parte dos meus experimentos em seu laboratório em especial professora Maria José pela receptividade e ensinamentos.

Ao Hospital Regional Norte (HRN-ISGH) na pessoa do Msc. Victor Fontenele por cederem gentilmente as amostras biológicas e ao laboratório São Carlos em Fortaleza pelo cuidado com o isolamento, triagem e estocagem dessas.

Aos meus colegas de vida acadêmica e laboratório da UFC, Carlos Victor, Walecleanes, Júlio César Prado e Flávia Silva, que contribuíram de alguma forma para a realização desse processo.

Aos meus colegas da UFPI, Felipe, Alyne, Márcio, Patrick pela acolhida, pelo apoio, amizade e contribuições nessa jornada. Por fim, sou feliz e demonstro gratidão a todas as pessoas que passaram pela minha vida, durante o período de mestrado, os colegas, educadores, amigos/as, afinal, somos nós seres coletivos!

“Deus nos conceda, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocamos nela, corre por nossa conta!”

(Chico Xavier)

RESUMO

A resistência aos antibióticos representa uma preocupação substancial nos sistemas de saúde em todo o mundo. O principal mecanismo que impulsiona a rápida disseminação de cepas multirresistentes em ambientes hospitalares é a aquisição de genes de resistência. O objetivo deste estudo foi analisar o perfil de sensibilidade antimicrobiana e identificar a presença de genes de resistência em *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes atendidos em um hospital terciário do estado do Ceará, Brasil. No período de abril/2021 a maio/2022 foram coletados 56 espécimes desse microrganismo resistentes a carbapenêmicos. A identificação bacteriana e o perfil de sensibilidade foram realizados no sistema automatizado VITEK®2 (bioMérieux), a análise molecular para a detecção dos genes bla KPC, bla NDM, bla OXA-48 e bla IMP foi realizada por reação em cadeia da polimerase convencional. Entre os pacientes dos quais foram isolados esses microrganismos, a relação de gênero foi proporcional a 50%, as bactérias foram isoladas principalmente de sangue (42,8%), sendo 44,6% de casos relacionados a Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). Quanto à sensibilidade aos antimicrobianos, todos foram resistentes às cefalosporinas, ceftazidima e cefepima. Por outro lado, a maioria (96,4%) foi sensível à Colistina. Das cepas analisadas, 92,8% eram multidroga resistentes (MDR), enquanto 3,5% eram extensivamente resistentes (XDR). O gene bla NDM foi o mais prevalente, detectado em 51,8% dos isolados, seguido por bla KPC (17,8%), bla IMP (7,2%) e bla OXA-48 (5,3%). Além disso, 8,9% dos isolados apresentaram coexistência de bla NDM/KPC e 1,8% de bla KPC/OXA-48. Com base nos resultados obtidos concluímos que todas as cepas testadas eram resistentes a algum antibiótico da classe dos carbapenêmicos, principalmente ao Ertapenem. Dentre os demais antibióticos testados, o mais efetivo foi a Colistina. A maioria das cepas foi coletada do sangue dos pacientes e o setor de hospitalização com maior número de coletas foi o centro cirúrgico. Outro dado alarmante é que, mais da metade dos pacientes internados foram admitidos devido a infecção adquirida na comunidade. Observou-se ainda, uma alta prevalência de genes de resistência estudados, com destaque para o bla NDM e bla KPC, sendo encontrada uma relação significativa entre a presença do gene do bla NDM e a resistência do microrganismo ao antibiótico Imipenem.

Palavras-chave: Carbapenemases; IRAS; Multirresistentes; Resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Antibiotic resistance represents a substantial concern in healthcare systems around the world. The main mechanism that drives the rapid spread of multidrug-resistant strains in hospital environments is the acquisition of resistance genes. The aim of this study was to analyze the antimicrobial sensitivity profile and identify the presence of resistance genes in *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients treated at a tertiary hospital in the state of Ceará, Brazil. From April/2021 to May/2022, 56 specimens of this carbapenem-resistant microorganism were collected. Bacterial identification and sensitivity profile were performed on the automated VITEK®2 system (bioMérieux), molecular analysis of the *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48} and *bla*_{IMP} genes was performed by conventional polymerase chain reaction. Among the patients from whom these microorganisms were isolated, the gender ratio was proportional to 50%, the bacteria were isolated mainly from blood (42.8%), with 44.6% of cases related to Healthcare-Associated Infections (HAIs). Regarding sensitivity to antimicrobials, all were resistant to cephalosporins, ceftazidime and cefepime. On the other hand, the majority (96.4%) were sensitive to Colistin. Of the strains analyzed, 92.8% were multidrug resistant (MDR), while 3.5% were extensively resistant (XDR). The *bla*_{NDM} gene was the most prevalent, detected in 51.8% of isolates, followed by *bla*_{KPC} (17.8%), *bla*_{IMP} (7.2%) and *bla*_{OXA-48} (5.3%). Furthermore, 8.9% of the isolates showed coexistence with *bla*_{NDM/KPC} and 1.8% with *bla*_{KPC/OXA-48}. In this study, all strains tested were resistant to some antibiotics from the carbapenem class, mainly to Ertapenem. Among the other antibiotics tested, the most effective was Colistin. Most of the strains were collected from patients' blood and the hospitalization sector with the highest number of collections was the surgical center. Another alarming fact is that more than half of hospitalized patients were admitted due to community-acquired infections. A high prevalence of resistance genes studied was also observed, with emphasis on *bla*_{NDM} and *bla*_{KPC}, with a significant relationship being found between the presence of the *bla*_{NDM} gene and the resistance of the microorganism to the antibiotic Imipenem.

Keywords: Carbapenemases; HAIs; Multidrug-resistant; Antimicrobial resistance.

LISTA DE FIGURAS
ARTIGO DE REVISÃO

Figura 1 -	Flowchart of the methodological steps for the selection of articles.....	25
Figura 2 -	Main collection sites of CRKP isolates in the revised studies.....	33
Figura 3-	Prevalence relative of carbapenem resistance genes in <i>K. pneumoniae</i>	33
Figura 4-	Global dissemination patterns of primary carbapenem resistance genes.....	34

LISTA DE TABELAS
ARTIGO DE REVISÃO

Table 1 – Demographic profile of participants in each study analyzed in this review 31

Table 2- Characterization of the studies on nosocomial CRKP infections included in this....32

LISTA DE FIGURAS
ARTIGO EXPERIMENTAL

Figura 1 - Correlação infecção IRAS/ Comunidade com a presença de genes carbapenêmicos	46
Figura 2 - Distribuição de MDR produtor de carbapenemases. <i>Klebsiella pneumoniae</i> com base tipos de amostras línicas	48

LISTA DE TABELAS
ARTIGO EXPERIMENTAL

Tabela 1 –	<i>Primers</i> para amplificação dos genes	43
Tabela 2 –	Frequência de <i>K. pneumoniae</i> e perfil epidemiológico dos pacientes internados no HRN.....	45
Tabela 3 –	Perfil de Sensibilidade Antimicrobiana de <i>K. pneumoniae</i> isolados de pacientes internados no HRN.....	46
Tabela 4 –	Correlação da presença dos genes com resistência a antibióticos carbapenêmicos em isolados <i>K. pneumoniae</i>	46
Tabela 5–	Relação entre a presença do gene <i>bla</i> _{NDM} em cepas de <i>K. pneumoniae</i> com resistência aos antibióticos Imipenem e Meropenem.....	50
Tabela 6–	Relação entre a presença do gene <i>bla</i> _{KPC} em cepas de <i>K. pneumoniae</i> com resistência aos antibióticos Imipenem e Meropenem.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BGN	Bactéria Gram-negativa
BGN-NF	Bactéria Gram-negativa-Não Fermentadora
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
<i>Bla</i>	Betalactamases
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
COVID-19	Doença Coronavírus-19
CRKP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Resistente a Carbapenêmico
CZA	Ceftazidima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESBL	Extended Spectrum β -Lactamase
FAMED	Faculdade Medicina-UFC, Sobral-Ceará
FEP	Cefepime
GECA	Gastroenterocolite aguda
HRN	Hospital Regional Norte
HCL	Ácido Clorídrico
IC	Intervalo de Confiança
IMP	Imipenemase Metallo- β -lactamase
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ISGH	Instituto de Saúde e Gestão Hospitalar
ISC	Infecções de sítio cirúrgico
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LAMP	Laboratório de Microbiologia e Parasitologia
LASAN	Laboratório de Doenças Infecciosas, Parasitárias e Microbiologia
MAPA	Ministério da Agricultura
MBL	Metallo- β -lactamases

MDR	Multidroga resistente
MDR-KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Multidroga Resistente
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NDM	Nova Delhi metalo-β-lactamase-1
NT	Não testado
OIA	Intermediário
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OXA -48	Enzimas hidrolisantes de oxacilina-48
Pb	Pares de Bases
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PIPE- TAZO	Piperacilina Sódica +Tazobactam sódico
PubMed	<i>National Library of Medicine</i>
RAM	Resistência Antimicrobiana
RPA	Resíduos Padronizados Ajustados
RC	Razão de Chances
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TBE	Tris/Borato/EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TRITON X	Surfactante aniônico
TSA	Teste de Sensibilidade Antimicrobiana
UCE	Unidade de Cuidados Especiais
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VIM	Verona integron-encoded metallo-β-lactamase
XDR	Extensivamente Resistente a drogas

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
–	Menos
=	Igual
~	Aproximadamente
<	Menor que
>	Maior que
μL	Microlitro
μM	Micrometro
°C	Grau Celsius
crf	Força centrífuga relativa
g/min	Gravidade de rotação/minuto
P	Nível de Significância
®	Marca registrada
mL	Mililitro
m ²	Metro quadrado
min	Minuto
β	Beta
U	Unidades
h	Horas
n	Numero
s	Segundos
X	Veze (Multiplicação)
x ²	Qui Quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	JUSTIFICATIVA.....	19
3	RELEVÂNCIA	20
4	OBJETIVOS.....	21
4.1	Objetivo Geral	21
4.2	Objetivo Específico.....	21
5	ARTIGOS	22
5.1	Artigo Revisão	22
5.2	Artigo Experimental	39
	ANEXO	61
	REFERENCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana (RAM) vem aumentando a cada ano e se tornando um problema mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a RAM tem como definição a “capacidade de um microrganismo impedir a atuação de um antimicrobiano”, o que tem, como consequências, tratamentos ineficientes e infecções persistentes. O relatório mais recente da Organização Mundial de Saúde (OMS) revela um crescente aumento dos elevados níveis de resistência principalmente em bactérias que são responsáveis por sepse em ambientes hospitalares (WHO, 2022).

A resistência é um mecanismo de defesa no qual os microrganismos apresentam meios para impedir a ação dos antimicrobianos, que têm como meta eliminá-los, agindo de tal forma que o antibiótico perca sua ação bacteriostática ou bactericida. Como consequência, as bactérias conseguem crescer e multiplicar-se mesmo com concentrações altas de fármacos destinados ao seu combate (Pereira *et al.*, 2023).

Entre os mecanismos de resistência bacterianos, alguns se destacam, incluindo: redução da permeabilidade da membrana externa bacteriana, perda de porinas, alterações nos sítios de ligação dos antibióticos, hiperexpressão de bombas de efluxo e a produção de enzimas betalactamases (Do Prado *et al.*, 2023). O principal mecanismo que impulsiona a rápida disseminação de cepas multirresistentes em ambientes hospitalares é a aquisição de genes de resistência e a subsequente produção de enzimas betalactamases (Shen *et al.*, 2023).

Essas enzimas estão intimamente associadas ao aumento da resistência aos carbapenêmicos, uma classe crucial de antibióticos usada em casos de infecções graves e persistentes (Silva *et al.*, 2024). A capacidade das bactérias de adquirir esses genes e sintetizar betalactamases amplia sua sobrevivência em ambientes hospitalares, onde a exposição frequente aos antibióticos cria uma pressão seletiva, facilitando a rápida disseminação de cepas resistentes. Isso representa um desafio substancial para o controle de infecções hospitalares (Zhang *et al.*, 2019).

Dentre os patógenos que causam doenças ligadas à multirresistência, a bactéria *Klebsiella pneumoniae* Multidroga-resistente (MDR-KP) tem se apresentado com elevada frequência, principalmente em ambiente hospitalar, por causa de sua alta capacidade de adquirir e transferir genes que possuem informações de mecanismos de multirresistência (Ruiz *et al.*, 2018). *K. pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete altamente virulenta, capaz de causar uma variedade de doenças graves em humanos, incluindo pneumonia, abscessos hepáticos, infecções do trato urinário e septicemia, amplamente ligado a problemas

de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e pode se apresentar como um patógeno oportunista, pois está associado a infecções de paciente imunocomprometidos (Baraka *et al.*, 2023). A resistência aos carbapenêmicos nestes microrganismos é mediada principalmente pela presença das enzimas carbapenemases (Vamsi *et al.*, 2022).

Dentre as carbapenemases, as que vem demonstrando importância clínica estão *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC), metalo- β -lactamases, como a Nova Delhi (NDM), Imipinemase metalo- β -lactamases (IMP) e as enzimas hidrolisantes de oxacilina-48 (OXA-48) (Ruiz *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2024). Conhecer as enzimas carbapenemases produzidas pelas cepas circulantes, bem como os genes que conferem tal fenótipo de resistência auxilia na investigação epidemiológica, sendo crucial para um planejamento estratégico, reduzindo assim os surtos de infecção por esses microrganismos (Vamsi *et al.*, 2022).

As bactérias multidroga resistentes (MDR) apresentam um potencial risco a ser combatido, uma vez que as infecções causadas por esses microrganismos causam elevada morbimortalidade e são uma grande preocupação em todo o mundo. Dessa forma, o estudo dos mecanismos de resistência desses microrganismos ganha relevante importância, pois servirá como base para a terapêutica, principalmente por se concentrar nas características genéticas que podem variar entre as diferentes regiões (Rocha *et al.*, 2019).

Nesse contexto, a pandemia da COVID-19 foi uma ameaça mundial que pressionou o aumento da RAM (Resistência Antimicrobiana), com relevantes impactos na epidemiologia de demais doenças infecciosas (Kiffer *et al.*, 2023). No entanto, ainda há uma escassez de dados sobre resistência antimicrobiana e seus mecanismos associados, relacionados ao interstício da pandemia na região Nordeste do Brasil e, especificamente, no estado do Ceará.

O Hospital Regional Norte (HRN), com mais de 54 mil m² de área construída, é o maior hospital do interior da Região Nordeste, responsável por atender uma população estimada em 1,6 milhão de pessoas, oriundas dos 55 municípios integrantes da macrorregião Norte do Estado do Ceará, prestando atendimento 24h em urgência e emergência. É referência em pediatria, cirurgias torácicas, cirurgias vasculares e otorrinolaringologia, bem como no setor terciário (atendendo casos de média e alta complexidade). Tem como missão prover a assistência, ensino e pesquisa através do cuidado excelente, inovador, integrado à Rede de Saúde do Estado do Ceará (INSTITUTO DE SAÚDE E GESTÃO HOSPITALAR - ISGH, 2024).

Dados da Comissão de Controle da Infecção Hospitalar (CCIH) do HRN demonstraram um aumento na prevalência de IRAS por *Klebsiella* sp., que passou de 8,81% no

ano de 2021 para 11,06% em 2022 (ISGH, 2023).

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade antimicrobiana e detectar a presença de genes de resistência em cepas de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes assistidos no HRN, em Sobral-CE.

2 JUSTIFICATIVA

A execução da pesquisa justifica-se pelo fato de que as espécies de *Klebsiella* estejam entre os patógenos mais prevalentes como causa de IRAS no HRN, mas que são desconhecidos os pormenores dessas infecções, principalmente no que diz respeito às condições dos pacientes que são mais suscetíveis a esses microrganismos, o ambiente clínico onde há maior prevalência e a variação relacionada à resistência antimicrobiana.

Além disso, reconhecer padrões em infecções hospitalares dará um direcionamento nas decisões clínicas dos médicos assistentes, antes mesmo da possibilidade de verificação por antibiograma da sensibilidade antimicrobiana.

3 RELEVANCIA

Considerando que cada unidade hospitalar guarda uma microbiota bacteriana específica e que o estudo dos microrganismos em seus aspectos mais pormenorizados contribui com o reconhecimento situacional no que concerne a resistência bacteriana, a observação do número de infecções por esses microrganismos desperta o interesse de realizar o estudo da resistência aos antimicrobianos e da diversidade genômica associada a esses fatores de resistência como um modo de fornecer subsídios para escolha de terapêutica adequada aos pacientes, contribuindo assim, para o uso racional dos antimicrobianos e um melhor prognóstico (Marques *et al.*, 2023).

É importante salientar que quando tratamos de infecções bacterianas o tempo é um fator crucial no tratamento. Logo, conhecer a epidemiologia hospitalar nesse âmbito auxiliará na escolha de antibióticos na terapia empírica.

Dessa forma, a investigação do perfil de sensibilidade antimicrobiana e dos genes associados à resistência antimicrobiana de isolados nosocomiais de *K. pneumoniae* no HRN se caracteriza pela relevância existente no domínio dessas informações, já que elas poderão ser úteis para o controle da disseminação desses patógenos no hospital pesquisado, o que trará uma implicância direta nos eixos de Segurança do Paciente e melhora na qualidade da assistência prestada.

4 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a sensibilidade antimicrobiana e detectar a presença de genes de resistência em cepas de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes assistidos no HRN, em Sobral-CE.

Objetivos Específicos

- Caracterizar a ocorrência de infecções causadas por *K. pneumoniae* em pacientes atendidos no Hospital Regional Norte (HRN) e correlacionar com o gênero do paciente, sítio de coleta, setor de hospitalização e desfecho clínico;
- Analisar o perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes com infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e infecções adquiridas na comunidade assistidos no HRN;
- Investigar a presença dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{OXA-48} nas cepas de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes com infecções em assistência no HRN;
- Correlacionar a presença dos genes de resistência citados com a resistência a carbapenêmicos.

5 ARTIGOS

Artigo de Revisão

Artigo publicado no periódico -

Archives of Current Research International (Qualis B1)



Current Global Occurrence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) Infections in Hospitalized Patients: A Literature Review

Martinair Santana da Silva ^{a*}, Júlio César Sousa Prado ^a, Maria Walcleanes Magalhães de Oliveira ^a, Patrick Veras Quelemes ^b and Francisco Cesar Barroso Barbosa ^a

^a Postgraduate Program in Sciences and Health, Federal University of Ceará (UFC), Sobral, CE. ^b Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brazil.

RESUMO

A resistência antimicrobiana (RAM) é um problema global crescente. Um dos principais mecanismos de resistência é a capacidade dos micróbios de desativar medicamentos antimicrobianos através da produção de enzimas β -lactamases de espectro expandido (ESBL), como as carbapenemases. Dentre os patógenos associados à multirresistência, a *Klebsiella pneumoniae* apresenta alta frequência, principalmente em ambientes hospitalares. Este estudo apresenta uma revisão narrativa da literatura das bases de dados científicas da National Library of Medicine (PubMed) e da Cochrane Library sobre a ocorrência de infecções por *K. pneumoniae* resistentes a carbapenem (CRKP) em pacientes hospitalizados, identificando estudos atuais que podem contribuir para compreender a propagação de bactérias resistentes. A revisão foi realizada em setembro de 2023 com o objetivo de resumir as evidências. Foram aplicados critérios de inclusão e exclusão, e foram incluídos 20 artigos, abrangendo os continentes da América, África, Ásia e Europa, para selecionar os estudos mais recentes sobre a CRKP. Nos estudos analisados, os isolados nosocomiais originaram-se predominantemente de amostras de escarro, seguido de urina e sangue. A análise molecular revelou que a maioria dos microrganismos que exibem resistência aos carbapenêmicos abrigava os genes blaKPC, blaNDM e blaOXA-48. No entanto, existe uma variação epidemiológica entre os continentes, sublinhando a necessidade de mais conhecimento sobre a diversidade genética e a implementação de programas de cultura de vigilância ativa para facilitar uma ação imediata com terapia apropriada e risco mínimo para o paciente. Estas descobertas indicam a necessidade de maior vigilância por parte dos comitês de controle de infecções hospitalares para prevenir a potencial propagação e surtos de bactérias portadoras de genes de resistência aos carbapenem.

Palavras-chave: Genes de resistência a antibióticos; infecções nosocomiais; resistência aos carbapenêmicos; bactérias multirresistentes.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) is an escalating global issue. One of the primary resistance mechanisms is the ability of microbes to deactivate antimicrobial drugs through the production of expanded-spectrum β -lactamases enzymes (ESBL), such as carbapenemases. Among the pathogens associated with multidrug resistance, *Klebsiella pneumoniae* has a high frequency, particularly in hospital settings. This study presents a narrative review of the literature from the scientific databases of the National Library of Medicine (PubMed) and the Cochrane Library on the occurrence of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (CRKP) infections in hospitalized patients, identifying current studies that may contribute to understand the spread of resistant bacteria. The review was conducted in September 2023 with the aim of summarizing evidence. Inclusion and exclusion criteria were applied, and 20 articles were included, covering the continents of the America, Africa, Asia, and Europe, to select the most recent studies about CRKP. In the studies analyzed, nosocomial isolates predominantly originated from sputum samples, followed by urine and blood. Molecular analysis revealed that most microorganisms exhibiting resistance to carbapenems harbored the blaKPC, blaNDM, and blaOXA-48 genes. However, there is epidemiological variation among continents, underscoring the need for more knowledge about genetic diversity and the implementation of active surveillance culture programs to facilitate prompt action with appropriate therapy and minimal patient risk. These findings indicate a necessity for heightened vigilance by hospital infection control committees to prevent potential spread and outbreaks of bacteria carrying carbapenem resistance genes.

Keywords: Keywords: Antibiotic resistance genes; nosocomial infections; carbapenem resistance; multidrug-resistant bacteria.

1 INTRODUCTION

Antimicrobial resistance (AMR) is experiencing a continuous escalation and has emerged as a paramount global public health concern. According to the World Health Organization [1], AMR engenders inefficacious treatments and persistent infections. The latest WHO report reveals a significant increase in high resistance levels, particularly among bacteria accountable for sepsis within hospital environments.

Resistance acts as a defense mechanism whereby microorganisms thwart the action of antimicrobials, making antibiotics ineffective in their bacteriostatic or bactericidal effects. Consequently, bacteria proliferate despite high concentrations of drugs designed to combat them [2]. Prominent mechanisms contributing to antimicrobial resistance include the production of enzyme inactivators, alteration of antibiotic target sites, generation of efflux pumps, and modification of the permeability of bacterial cell outer membranes [3].

One of the main mechanisms of resistance is the ability of several strains to inactivate antimicrobial drugs through the production of expanded-spectrum β -lactamases enzymes (ESBL). Among them, carbapenemases are particularly notable [4]. KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) is a serine beta-lactamase. It can hydrolyze most beta-lactams, especially carbapenems [5]. They are the most found enzymes, especially in enterobacteria,

becoming one of the most important carbapenemases since its discovery in the United States in 1996 [6].

It is responsible for the production of carbapenemases that belong to Ambler's class A serine β -lactamase K, such as: Pneumoniae carbapenemase (KPC), class B metallo- β -lactamase (MBL) of the IMP, VIM or NDM family and beta-lactamase, which holds similarities with OXA-48 belonging to class D [7,8].

Carbapenem antibiotics possess a broad spectrum against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, enabling resistance against degradation by most β -lactamases. Consequently, they are deemed the last option in the therapy of severe and potentially fatal infections, operating through the inhibition of cell wall synthesis and inactivation of proteins crucial for cell wall formation [9].

This pathogen is implicated in various infections such as pneumonia, bloodstream infections, urinary tract infections, and surgical wound infections, often culminating in generalized, frequently fatal, infections [12]. Resistance of *K. pneumoniae* to carbapenems in hospital settings is on the rise, particularly in intensive care units (ICUs), posing a significant public health challenge [13].

Given the multitude of factors contributing to resistance, the efficacy of specific potent drugs diminishes against multidrug-resistant microorganisms. Understanding the biochemical and genetic mechanisms related antimicrobial resistance is imperative given the substantial increase in mutations [14].

This study presents a narrative review of the literature on the occurrence of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (CRKP) infections in hospitalized patients, aiming to identify recent studies that could enhance comprehension of the pathogenesis of multidrug-resistant (MDR) bacteria and mitigate their dissemination.

2 METHODOLOGY

The review was conducted in the September 2023 with the aim of summarizing the most recent evidence on CRKP context. The search was performed on the MEDLINE (PubMed) and Cochrane Library databases using the following keywords: *Klebsiella pneumoniae*, carbapenem resistance, and antimicrobial resistance. The operators AND and OR were utilized within the keywords to enhance search performance. Articles published between 2020 and 2023 (the last four years) in either English or Portuguese were selected for analysis. Literature

reviews and other studies that did not meet the specified criteria were excluded, as work that did not describe the analysis of carbapenemases resistance genes in *K. pneumoniae*.

3 RESULTS

3.1 Selected Articles

In total, 100 records were initially selected following the inclusion and exclusion criteria. After removing duplication and excluding articles that did not fit the proposed theme, there were 20 articles remaining for qualitative analysis (Fig. 1).

3.2 Findings from the Review

The selected studies were published in the period from 2020 to 2023 and analyzed nosocomial infections by CRKP. The studies spanned the continents of the Americas, Africa, Asia, and Europe. Next, an overview of the main findings of the studies listed for this review will be presented, divided according to their continents of origin.

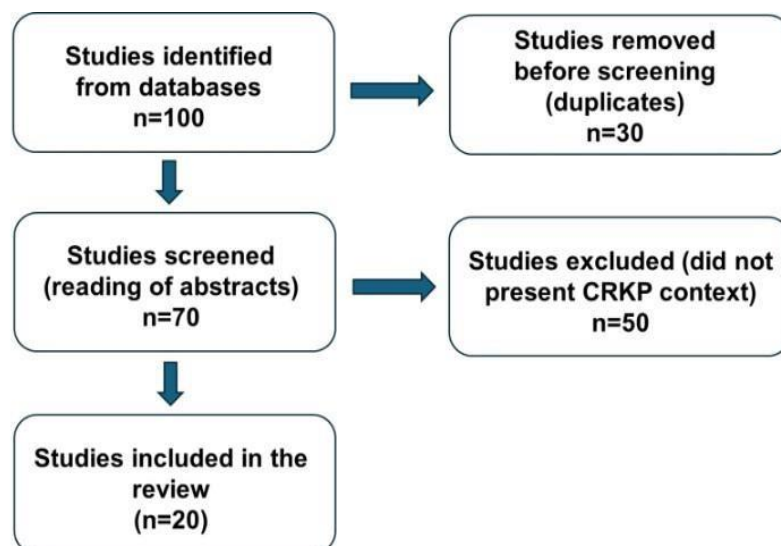


Fig. 1. Flowchart of the methodological steps for the selection of articles

Source: Authors (2023)

3.2.1 Asia

Chen *et al.*, [15] in China, documented isolates from different hospital sectors spanning 2017 to 2019, with a prevalence of samples originating from ICUs, primarily sputum samples. The investigation into CRKP revealed the presence of *bla*NDM-1 in 78.26% of the strains and *bla*NDM-5 in 17.39%. Ceftazidime (CZA) resistance was observed in 19.01% of cases, attributed to increased antimicrobial hydrolysis and reduced action of OmpK35.

In Iran, Zahedi *et al.*, [16] investigated resistance to colistin in strains originating mainly from the trachea. In this case, the isolates showed molecular characteristics of *K. pneumoniae* and the genes identified in these strains were *bla*KPC (58.6%), followed by *bla*IMP, *bla*VIM, and *bla*OXA-48, with 29.0%, 14.2% and 7.4%, respectively. Furthermore, 92.6% of the strains also showed resistance to colistin, which makes the situation even more worrying, since polymyxin antibiotics are used as a last resort for the treatment of infections caused by bacteria with resistance to carbapenems, showing that resistance is growing worldwide alarmingly.

In the same period, Taha *et al.*, [17] investigated patients with nosocomial infections at King Abdulaziz Medical City, and King Abdulaziz University Hospital in Saudi Arabia. The microorganisms responsible for these infections were isolated mainly from urine samples positive for *K. pneumoniae*, with higher frequency of the *bla*OXA-48 gene (79%) than the *bla*NDM gene (11.7%). The results demonstrated a large increase in carbapenem-resistant Enterobacterales from 2017 to 2019 in Saudi Arabia and the predominance of the *bla*OXA-48 gene in this region. All strains tested showed resistance to most of the antibiotics tested, except for tigecycline and colistin.

Shen *et al.* [18] made a comparison between two populations in Zunyi, China, between 2018 and 2020 to determine the difference in the prevalence of carbapenemase-producing genes between children and adults. They reported prevalence of the genotypic profile *bla*NDM (72.3%), followed by *bla*KPC (24.5%) and *bla*VIM (3.02%) among the microorganisms. In isolates positive for *bla*NDM, 92.6% were from children and 7.4% from adults. Moreover, 74.3% of isolates demonstrated an MDR phenotype, and 25.7% pan-resistant or extensively resistant.

In another recent studies carried out in China and Iran, differences in genetic prevalence in relation to the expression of carbapenemases were observed. In China, Wang *et al.*, [19] demonstrated that *K. pneumoniae* was the predominant microorganism, representing

around 64.6% of isolates from nosocomial infections, with sputum as the main source, and the most found gene in these bacteria was *blaKPC-2* (61.49%).

In Iran, Soltani *et al.*, [20] analyzed CRKP isolated from several clinical samples, mainly urine, and detected a predominance of the *blaOXA-48* genes (78.7%), followed by *blaNDM* (19.6%) and *blaKPC* (14.7%). Ghotaslou *et al.*, [21] also conducted a survey in Iran observing several strains of CRKP isolated from urine, also detected a higher occurrence of *blaOXA-48* genes (76%), followed by *blaNDM* (50%), *blaIMP* (22%), *blaVIM* (10 %) and *blaKPC* (2%). Based on these studies, the concern with resistance developed in the hospital environment was highlighted and the need to implement preventive and educational measures among professionals was emphasized, aiming to avoid hospital infections.

In Pakistan, Gondal *et al.*, [22] analyzed bacteria isolated from various biological samples between 2019 and 2022, most of which came from surgical wounds. The authors reported that 42.1% of them showed resistance to carbapenems, significantly related to strains of *K. pneumoniae*, and the genes in order of prevalence were: *blaNDM* (41.1%), *blaOXA-48* (32.6%), *blaKPC* (5.5%) and *blaIMP* (2.7%). Some strains harbored more than one of these genes, with the presence of *blaNDM/OXA-48* (11.4%), *bla OXA-48/VIM* (3.1%), and *bla VIM/IMP* (0.3%) and *bla OXA-48/IMP* (0.1%).

3.2.2 Europe

In Europe, research from three regions on the genetic diversity of CRKP was selected. In southern Europe, two studies stood out. Afolayan *et al.*, [23] revealed predominance of *blaKPC* (60%), *blaVIM* (27%), *blaNDM* (9.7%) and *blaOXA-48* (2.92%) in Greece in the period from 2019 to 2023. In turn, Bovo *et al.* [24], in Italy, investigated the impact of the COVID-19 pandemic between 2019 and 2021, observing a greater occurrence of antimicrobial resistance due to the widespread increase in *blaKPC* (75.4%), producers of *blaOXA-48* (8.3%), *blaVIM* (6.7%), *blaKPC* and *blaOXA-48* together (5.4%), and *blaNDM* (4.2%). In this study, all specimens that contained *blaKPC* and *blaOXA-48* simultaneously were resistant to ceftazidime/avibactam, meropenem/vaborbactam, imipenem/relebactam and cefiderocol.

These authors point out that this resistance may have been linked to the presence of the gene *blaOXA-48* which induces non-sensitivity to beta- lactamase inhibitors, such as vaborbactam and relebactam, while resistance to ceftazidime/avibactam is linked to mutations

in the gene *bla*_{KPC3}, causing changes in its structure making the action of antimicrobials difficult.

In Central Europe, Nordmann *et al.*, [25] evaluated strains producing carbapenemases and sensitive to ceftazidime/avibactam, meropenem/vaborbactam and imipenem/relebactam in isolates collected in Switzerland between 2018 and 2020. They found that 40.3% of specimens were from *K. pneumoniae* and 35.3% *E. coli*. Regarding the presence of the genes *bla*_{KPC} (32%), *bla*_{OXA-48} (32%) and *bla*_{NDM} (24%), identified in *K. pneumoniae*, they observed that meropenem/vaborbactam were more effective against enterobacteria that produce carbapenemases.

In Eastern Europe, from 2017 to 2019, Fischer *et al.*, [26] detected a higher prevalence of resistant microorganisms in urine samples from ICUs patients in Romania. In 47 *K. pneumoniae* isolates analyzed, the frequency of *bla*_{OXA-48} and *bla*_{KPC} genes were 15% and 18%, respectively.

Sarowska *et al.*, [27] carried out microbiological identification of samples from blood in a hospital in Poland in 2020, identifying 4.4% of the microorganisms as *K. pneumoniae*. Of these, 50% were resistant to carbapenems, with 82.1% harboring *bla*_{NDM}, 14.3% producing *bla*_{VIM} and one isolate with *bla*_{NDM} together with *bla*_{OXA-48}. The tests demonstrated that in Poland, resistance to carbapenems has been increasing, indicating the importance of testing hospitalized patients to prevent or control possible outbreaks.

3.2.3 Africa

In Northern Africa two studies in Egypt were analyzed. The first was Baraka *et al.*, [28], who in 2019 carried out molecular detection mainly from sputum and found specimens with at least two carbapenem resistance genes. All tested isolates contained the *bla*_{OXA} genes, with presence of *bla*_{VIM} (93%), *bla*_{NDM} (85.5%) and *bla*_{IMP} (63%) and, to a lesser extent, *bla*_{KPC} gene (17%).

The other study, carried out by El-kady *et al.*, [29] in the period from 2020 to 2021, investigated strains of *K. pneumoniae* from cancer patients, also in Egypt, and detected the genes *bla*_{KPC} (42.6%), *bla*_{OXA-48} (23.4%), *bla*_{OXA-48/NDM} (10.6%) and *bla*_{IMP} (2.1%). These strains were mostly isolated from blood samples. The minimum inhibitory concentration of ceftazidime (CZA) demonstrated that 25.5% of the species analyzed were resistant to this antibiotic, a fact the authors attributed to mutations in the gene *bla*_{KPC}, along with overexpression and modification of outer membrane proteins.

According to the study, a high level of resistance to CZA was seen in both studies, which can be attributed to the incorrect empirical use of antibiotics, together with the lack of molecular analyses of the isolates.

In West Africa, in seven tertiary hospitals in Nigeria between 2018 and 2019, Odewale *et al.*, [30] found *K. pneumoniae* (30.5%) in most urine samples. The carbapenem resistance gene with greatest prevalence in these specimens was *bla*_{VIM} (43.0%), followed by *bla*_{OXA-48} (28.95%), *bla*_{IMP} (22.7%), *bla*_{NDM} (17.25%) and *bla*_{KPC} (13.3%). The resistance found in these nosocomial samples may have been related to inefficient practices in controlling hospital infections.

3.2.4 Americas

In South America, specifically in Brazil, Flores *et al.*, [31] reported that 16% of strains isolated from rectal swabs from ICUs patients in Rio de Janeiro, from 2016 to 2017, were phenotypically identified as carbapenemase producers. Of these, 11% had *bla*_{NDM} gene, among these, 27% revealed co-occurrence with *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, and *bla*_{VIM}, 46% with *bla*_{KPC} and *bla*_{VIM}, and 18% with *bla*_{VIM}.

In other study, Vivas *et al.*, [32] analyzed *K. pneumoniae* in public hospitals in Sergipe, Brazil, finding presence of the genes *bla*_{NDM} (74%), *bla*_{KPC} (8%), in addition to *bla*_{NDM} and *bla*_{KPC} together (1.2%). Combined drug therapy of two or three treatment options was tested, with the combinations of polymyxin B with amikacin and polymyxin B with meropenem, presenting the most satisfactory responses for the isolates tested. For those authors, in clinical practice, empirical antimicrobial treatment should be considered, since delaying therapy can lead to unfavorable clinical outcomes in patients with compromised immunity.

Kiffer *et al.*, [33] analyzed the impact of COVID-19 on carbapenemases genes in Brazil, in the period from 2015 to 2022, finding an increase in the frequency of *bla*_{NDM} from 4.1% in 2015 to 39.4% in 2022, and a decrease of *bla*_{KPC} from 74.5% to 55.1% in the same period. According to the authors, the decrease in the KPC enzyme may be related to the use in hospitals of faster resistance detection techniques, thus speeding up diagnosis and treatment. Thus, the epidemiology of these enzymes may also be changing in Brazil.

Estabrook *et al.*, [34] described the frequency of enterobacteria non-sensitive to meropenem in a surveillance study between 2018 and 2019 in North America, Asia, and the Pacific. Most isolates were *K. pneumoniae* (71.5%). There was variation by region in relation to carbapenemases, with metalobetalactamases dominant in Africa, the Middle East (49%), and

Asia/Pacific (59.4%). The gene *bla*OXA-48 was predominant in Europe (30%), while in Latin America, *bla*KPC was most present, with 51.9%. Meanwhile, in North America the presence of this gene was 53.6%.

3.3 Qualitative Analysis of Studies

Table 1 presents the studies analyzed in this review, as well as some of the demographic profile of the research participants. Overall, there was a predominance of males (72.73%), with the vast majority experiencing CRKP infections associated with respiratory issues or compromised patient immunity. Among female patients (27.27%), urinary infections were the primary concern.

Most patients, with an average age exceeding 50 years, were immunocompromised and admitted to ICUs. These characteristics pose as risk factors for infections caused by MDR pathogens.

The resistance genes diversity, as indicated in Table 2, illustrates the variations that can arise across different regions of the globe. Most publications concerning carbapenem resistance originate from various regions of Asia, including East, South, and the Middle East Asia. Such diversity may stem from factors such as environmental conditions, duration of hospitalization, medications administered, and protocols followed by healthcare professionals within the hospital setting.

In the articles analyzed, the isolates came from various types of biological samples from hospitalized patients, with predominance of sputum, followed by urine and blood. The Fig. 2 displays information about the main collection sites of CRKP isolates. It is important to highlight that this microorganism can be found in various sites of the human microbiota, and can cause various damages to the human body, resulting in pneumonia, urinary tract infections, bloodstream infections and meningitis [35].

Molecular analyses of the selected articles revealed that the most prevalent carbapenem resistance genes were *bla* KPC, *bla* NDM and *bla* OXA-48, as demonstrated in Fig. 3. It was noted that in East Asia, studies carried out in a different time frame demonstrated a gene change from *bla*NDM to *bla*KPC.

Table 1. Demographic profile of participants in each study analyzed in this review

	Author (Year)	Gender (%)	Average Age (Years old)
1	Flores et al. (2020) [31]	n/d*	n/d
2	Vivas et al. (2020) [32]	n/d	n/d
3	Chen et al. (2022) [15]	M-84/F-37**	72.54
4	Fischer et al. (2022) [26]	M-30/F-18	58.50
5	El-Kady et al. (2022) [29]	M-46/F-88	45.56
6	Soltani et al. (2022) [20]	M-28/F-33	56.70
7	Sarowska et al. (2022) [27]	n/d	n/d
8	Odevale et al. (2023) [30]	M- 59 /F-69	n/d
9	Shen et al. (2023) [18]	M-57/F-37	n/d
10	Zahedi et al. (2023) [16]	M-94/F-68	67.25
11	Baraka et al. (2023) [28]	n/d	n/d
12	Estabrook et al. (2023) [34]	n/d	n/d
13	Ghotaslou et al. (2023) [21]	M-30/F-20	58.00
14	Gondal et al. (2023) [22]	M-1288/882	n/d
15	Nordmann et al. (2023) [25]	n/d	n/d
16	Taha et al. (2023) [17]	M-109/F-71	62.80
17	Wang et al. (2023) [19]	n/d	n/d
18	Kiffer et al. (2023) [33]	n/d	n/d
19	Afolayan et al. (2023) [23]	M-129/F-82	50.00
20	Bovo et al. (2023) [24]	n/d	n/d

* n/d: No data; ** M: Male; F: Female.

Source: Authors (2023).

In the East Asia, there was a change from blaNDM to blaOXA-48. However, in South Asia, studies have demonstrated continued prevalence of blaNDM. In Mediterranean Europe, studies have shown that the blaKPC gene remains predominant, while in Western Europe there have been changes from blaOXA-48 to blaNDM, with prevalence of blaKPC and blaOXA-48 over bla NDM.

South Asia, studies have demonstrated continued prevalence of blaNDM. In Mediterranean Europe, studies have shown that the blaKPC gene remains predominant, while in Western Europe there have been changes from blaOXA-48 to blaNDM, with prevalence of blaKPC and blaOXA-48 over bla NDM.

Table 2. Characterization of the studies on nosocomial CRKP infections included in this review

	Author (year)	Country: Region	Population	Number of CRKP-infected patients	Resistance Genes (<i>bla</i>)
1	Flores et al. (2020) [31]	Brazil: Rio de Janeiro	4,463	103	NDM, KPC, OXA-48, VIM
2	Vivas et al. (2020) [32]	Brazil: Sergipe	147	83	NDM-1, KPC
3	Chen et al. (2022) [15]	China	121	23	NDM-1, NDM-5
4	Fischer et al. (2022) [26]	Romania: Clyj Napoca	75	27	OXA-48, KPC
5	El-Kady et al. (2022) [29]	Egypt: Mansoura	350	134	KPC, OXA-48, NDM, IMP
6	Soltani et al. (2022) [20]	Iran: Tabriz	468	61	OXA 48, KPC, NDM
7	Sarowska et al. (2022) [27]	Poland: Wrocław	115	58	NDM, VIM, OXA-48
8	Odeh et al. (2023) [30]	Nigeria	420	128	VIM, OXA, IMP, NDM, KPC, CMY, FOX
9	Shen et al.; 2023 [18]	China: Zunyi	94	94	NDM, KPC, VIM
10	Zahedi et al. (2023) [16]	Iran	162	162	KPC, IMP, VIM, OXA-48
11	Baraka et al. (2023) [28]	Egypt: El-Behira	100	80	OXA, VIM, NDM, IPM
12	Estabrook et al. (2023) [34]	North America/ Asia/ Pacific	2,228	1,592	KPC, OXA-48, NDM
13	Ghotaslou et al. (2023) [21]	Iran: Tabriz	87	50	OXA-48, NDM, IMP, VIM, KPC
14	Gondal et al. (2023) [22]	Pakistan: Lahore	789	283	NDM, OXA-48, KPC, VIM, IMP
15	Nordmann et al. (2023) [25]	Switzerland	150	61	KPC, OXA-48, NDM
16	Taha et al. (2023) [17]	Saudi Arabia: Jeddah	187	180	OXA-48, NDM
17	Wang et al. (2023) [19]	China: Shanghai	161	104	KPC-2
18	Kiffer et al. (2023) [33]	Brazil	169,320	41,301	KPC, NDM
19	Afolayan et al. (2023) [23]	Greece: Athens	392	205	KPC, VIM
20	Bovo et al. (2023) [24]	Italy: Bologna	56,091	957	KPC, OXA-48

Source: Authors (2023)

In the East Asia, there was a change from *bla*_{NDM} to *bla*_{OXA-48}. However, in South Asia, studies have demonstrated continued prevalence of *bla*_{NDM}. In Mediterranean Europe, studies have shown that the *bla*_{KPC} gene remains predominant, while in Western Europe there have been changes from *bla*_{OXA-48} to *bla*_{NDM}, with prevalence of *bla*_{KPC} and *bla*_{OXA-48} over *bla*_{NDM}.

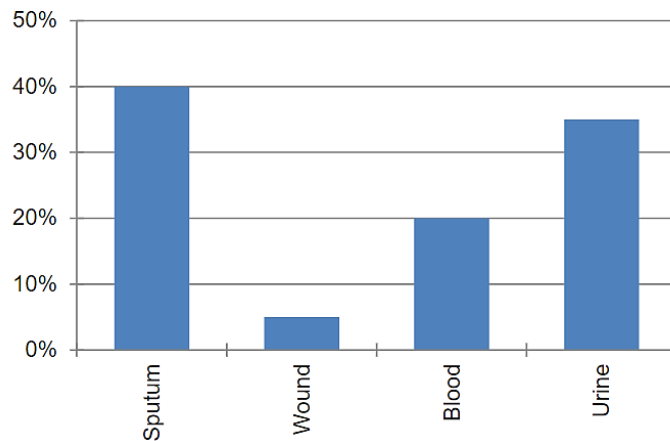


Fig. 2. Main collection sites of CRKP isolates in the revised studies.
Source: Authors (2023)

In Northern Africa there has been an increase in *bla*_{KPC} while in West Africa *bla*_{VIM} is most prevalent. In the Americas, large increases have been reported in *bla*_{NDM}, especially in Brazil, where Kiffer *et al.*, [33] reported an increase of 39.1% in a period of five years and found decrease in *bla*_{KPC} of 19.4%. Carbapenem resistance among *K. pneumoniae* in recent years has occurred due to transmissible carbapenemase genes such as *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}, which have been detected with large increases, suggesting a worldwide trend.

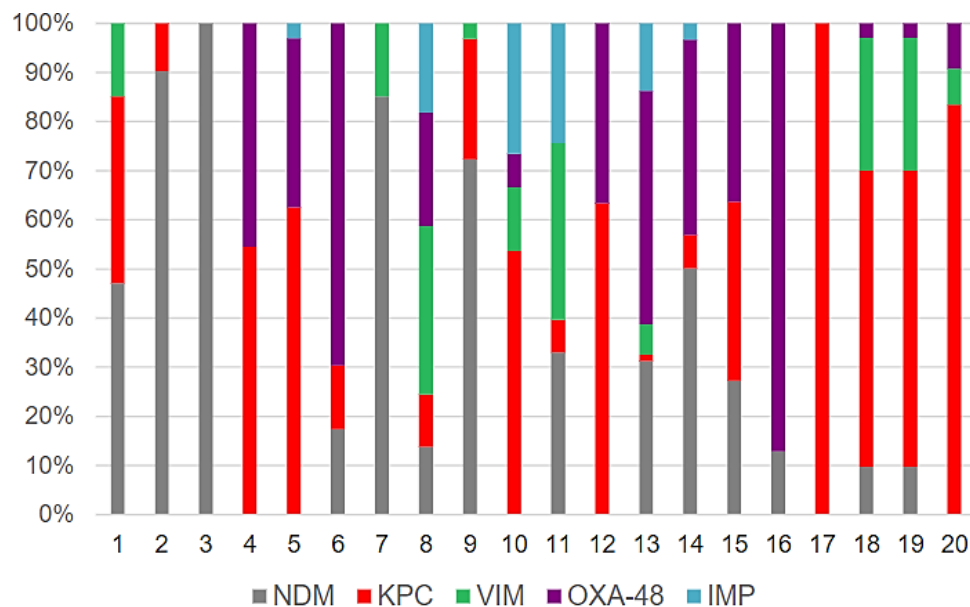


Fig. 3. Prevalence relative of carbapenem resistance genes in *K. pneumoniae* described in the revised studies (1-20, according to Table 2)
Source: Authors (2023)

According to Nordmann *et al.*, [25], the producers of NDM carry other types of resistance, such as ESBLs (mainly CTX-M 15) and other carbapenemases (OXA-48, VIM and KPC), which gives these strains their multi-resistance characteristics. The distribution of key resistance genes worldwide, as reported in revised studies from 2020 to 2023, is visualized in Fig. 4.

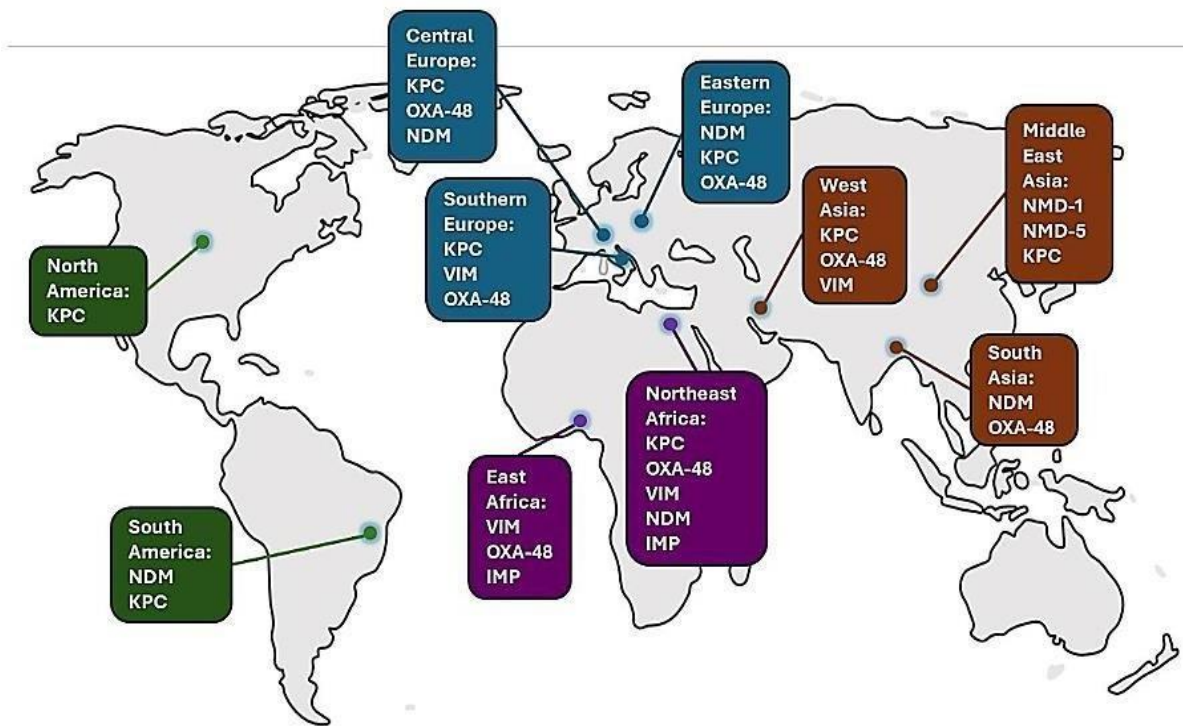


Fig. 4. Global dissemination patterns of primary carbapenem resistance genes in *K. pneumoniae*: insights from revised studies (2020-2023)

Source: Authors (2023)

4 CONCLUSION

The findings summarized here indicate an epidemiological variation of the hospital infections caused by *K. pneumoniae* among the continents, represented both by regional characteristics and by changes that have occurred in the same location. The difference among the types of resistance genes spread across the globe was also noticed. This emphasizes the imperative of garnering deeper insights into the spectrum of carbapenem resistance genes prevalent in each region and implementing structured surveillance programs for ongoing monitoring.

Such measures will facilitate prompt interventions, ensuring the administration of appropriate therapies and mitigating further risks to the health of immunocompromised patients

grappling with infections. Enhanced vigilance and infection control protocols within hospital settings are indispensable to curb the dissemination of infections, particularly amidst bustling environments, thereby averting outbreaks of multidrug-resistant microorganisms.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. WHO, World Health Organization Healthcare without avoidable infections: the critical role of infection prevention and control; 2016 Accessed August ,2023.
2. Brazil.National Health Surveillance Agency.Clinical Microbiology for the Control of ealthcare-Associated Infection.Brasilia: Anvisa; 2015.
3. Santajit SE, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in SKAPE Pathogens. BioMed Research International Pesquisa BioMed internacional; 2016.
4. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Treccarichi EM, Tumietto F, Marchese A, Bassetti M. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase– producing *K. pneumoniae*: Importance of combination therapy. Clinical infectious diseases. 2012;55(7):943-950.
5. Bush K. Bench-to-bedside review: The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. Critical care. 2010; 14:1-8.
6. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Stewart CD, Tenover FC. Novel carbapenem- hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2001;45(4):1151-1161.
7. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, Westblade LF Carbapenemase-producing organisms: A global scourge. Clinical infectious diseases. 2018;66(8):1290-1297.
8. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in gram-negative bacteria. Clinical Infectious Diseases. 2019;69(Supplement_7): S521- S528.
9. Lee Y & Bradley N. Overview and insights into carbapenem allergy. Pharmacy. 2019; 7(3):110.
10. Santos WMD, & Secoli SR. Economic burden of inpatients infected with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. Einstein (São Paulo). 2019;17: eGS4444.

11. Wyres KL, Lam MM & Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*. 2020;18(6): 344-359.
12. Zhang H, Johnson A, Zhang G, Yang Y, Zhang J, Li D, Xu Y. Susceptibilities of Gram-negative bacilli from hospital-and community-acquired intra-abdominal and urinary tract infections: A 2016–2017 update of the Chinese SMART study. *Infection and Drug Resistance*. 2019:905- 914.
13. Ripabelli G, Tamburro M, Guerrizio G, Fanelli I, Flocco R, Scutellà M & Sammarco ML. Tracking multidrug- resistant *Klebsiella pneumoniae* from an Italian hospital: molecular epidemiology and surveillance by PFGE, RAPD and PCR-based resistance genes prevalence. *Current microbiology*. 2018; 75:977-987.
14. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. 2016; 481-511.
15. Chen D, Xiao L, Hong D, Zhao Y, Hu X, Shi S & Chen F. Epidemiology of resistance of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* to ceftazidime-avibactam in a Chinese hospital. *Journal of Applied Microbiology*. 2022;132(1):237-243.
16. Zahedi Bialvaei A, Eslami P, Ganji L, Dolatyar Dehkharghani A, Asgari F, Koupahi H, Rahbar M. Prevalence and epidemiological investigation of mgrB- dependent colistin resistance in extensively drug resistant *Klebsiella pneumoniae* in Iran. *Scientific Reports*. 2023;13(1):10680.
17. Taha R, Mowallad A, Mufti A, Althaqafi A, Jiman-Fatani AA, El-Hossary D & Jawi N. H. Prevalence of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Western Saudi Arabia and increasing trends in the antimicrobial resistance of Enterobacteriaceae. *Cureus*. 2023;15(2).
18. Shen M, Chen X, He, J, Xiong L, Tian R, Yang G, Wu K. Antimicrobial resistance patterns, sequence types, virulence and carbapenemase genes of carbapenem- resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from a tertiary care teaching hospital in Zunyi, China. *Infection and Drug Resistance*. 2023:637-649.
19. Wang T, Zhu Y, Zhu W, Cao M & Wei Q. Molecular characterization of class 1 integrons in carbapenem-resistant Enterobacterales isolates. *Microbial Pathogenesis*. 2023;177, 106051.
20. Soltani E, Hasani A., Rezaee MA, Nahandi MZ, Hasani A & Gholizadeh P. An alliance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with precise capsular serotypes and clinical determinants: A disquietude in hospital setting. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*; 2022.
21. Ghotaslou R, Salahi B, Naderi G & Alizadeh N. High Frequency of *bla*OXA- 48like Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Nosocomial Infection in Azerbaijan, Iran. *Infection & Chemotherapy*. 2023;55(1):90.
22. Gondal AJ, Choudhry N, Bukhari H, Rizvi Z, Jahan S, Yasmin N. Estimation, Evaluation and Characterization of Carbapenem Resistance Burden from a Tertiary Care Hospital, Pakistan. *Antibiotics*. 2023;12(3): 525.
23. Afolayan AO, Rigatou A, Grundmann H, Pantazatou A, Daikos G & Reuter S. Three

Klebsiella pneumoniae lineages causing bloodstream infections variably dominated within a Greek hospital over a 15-year period. *Microbial Genomics*. 2023;9(8): 001082.

24. Bovo F, Amadesi S, Palombo M, Lazzarotto T, Ambretti S, Gaibani P. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* resistant to cefiderocol, ceftazidime/ avibactam, meropenem/vaborbactam and imipenem/relebactam co-producing KPC and OXA-181 carbapenemase. *JAC-Antimicrobial Resistance*. 2023;5(4): dlad099.

25. Nordmann P, Bouvier M & Poirel L. Efficacy of ceftazidime-avibactam, meropenem-vaborbactam, and imipenem- relebactam combinations against carbapenemase-producing Enterobacterales in Switzerland. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2023;42(9):1145-1152.

26. Fischer P, Pandrea S, Grigorescu MD, Stefanescu H, Tefas C, Hadade A, Ionescu D. The threat of carbapenem resistance in Eastern Europe in patients with decompensated cirrhosis admitted to intensive care unit. *Digestive and Liver Disease*. 2022;54(10):1385-1391.

27. Sarowska J, Choroszy-Krol I, Jama- Kmiecik A, Mączyńska B, Cholewa S & Frej-Madrzak M. Occurrence and characteristics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Poland A single centre study. *Pathogens*. 2022;11(8),859.

28. Baraka K, Abozahra R, Haggag M M & Abdelhamid S M. Genotyping and molecular investigation of plasmid- mediated carbapenem resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in Egypt. *AIMS microbiology*. 2023;9(2):228.

29. El-Kady RAEH, Elbaiomy MA, Elnagar RM. Molecular mechanisms mediating ceftazidime/avibactam resistance amongst carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from cancer patients. *Infection and Drug Resistance*. 2022;5929-5940.

30. Odewale G, Jibola-Shittu MY, Ojuronbe O, Olowe RA & Olowe OA. Genotypic Determination of Extended Spectrum β - Lactamases and Carbapenemase Production in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Southwest Nigeria. *Infectious Disease Reports*. 2023;15(3): 339-353.

31. Flores C, Bianco K, de Filippis I, Clementino MM & Romão C M C. Genetic relatedness of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* co-occurring VIM, KPC, and OXA-48 enzymes from surveillance cultures from an intensive care unit. *Microbial drug resistance*. 2020;26(10): 1219-1226.

32. Vivas R, Dolabella SS, Barbosa AAT, Jain S. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-and New Delhi metallo- beta-lactamase-positive *K. pneumoniae* in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2020; 53, e20200064.

33. Kiffer CR, Rezende TF, Costa-Nobre DT, Marinonio ASS, Shiguenaga LH, Kulek DNO & Pilonetto M. A 7-year Brazilian national perspective on plasmid-mediated carbapenem resistance in enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* complex and the impact of the coronavirus disease 2019 pandemic on their occurrence. *Clinical Infectious Diseases*. 2023;77(Supplement_1): S29-S37.

34. Estabrook M, Muyldermans A, Sahm D, Pierard D, Stone G, Utt E. Epidemiology of resistance determinants identified in meropenem-nonsusceptible Enterobacterales collected as part of a global surveillance study, 2018 to 2019. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2023;67(5): e01406-22.
35. Abbas R, Chakkour M, Zein El Dine H, Obaseki EF, Obeid ST, Jezzini A, Ezzeddine Z. General Overview of *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and the Role of Siderophores in Its Pathogenicity. *Biology*. 2024;13(2):78.

Artigo Experimental

Artigo a ser submetido no periódico - *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (Qualis A3)

Perfil de sensibilidade antimicrobiana e detecção de genes de resistência em cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes assistidos em um hospital terciário da Região Norte do Ceará

Martinair Santana da Silva^{1*}, Carlos Victor Fontenele Pinheiro¹, Maria Walcleanes Magalhães de Oliveira¹, Júlio César Sousa Prado¹, Flávia de Araújo Silva², Felipe Araújo de Alcantara Oliveira³, Márcio Leonardo de Moraes Nobre³, Alyne Pereira Lopes³, Maria José dos Santos Soares³, Patrick Veras Quelemes³, Francisco Cesar Barroso Barbosa^{1,2*}

¹ Health Sciences Graduate Program, Federal University of Ceará (UFC), Comandante Mauricélio Rocha Pontes Street, 100, Sobral, CE, Brazil

² Microbiology Laboratory, Federal University of Ceará, Comandante Mauricélio Rocha Pontes Street, 100, Sobral, CE, Brazil

³ Federal University of Piauí (UFPI), R. Dirce Oliveira - Ininga, Teresina, PI, Brazil.

*Correspondente: fcbarbosa@yahoo.com.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar o perfil de sensibilidade antimicrobiana e identificar a presença de genes de resistência em *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes atendidos em um hospital terciário do estado do Ceará, Brasil. No período de abril/2021 a maio/2022 foram coletados 56 espécimes desse microrganismo resistentes a carbapenêmicos. A identificação bacteriana e o perfil de sensibilidade foram realizados no sistema automatizado VITEK®2 (bioMérieux), a análise molecular para a detecção dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{IMP} foi realizada por reação em cadeia da polimerase convencional. Entre os pacientes dos quais foram isolados esses microrganismos, a relação de gênero foi proporcional a 50%, as bactérias foram isoladas principalmente de sangue (42,8%), sendo 44,6% de casos relacionados a Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). Quanto à sensibilidade aos antimicrobianos, todos foram resistentes às cefalosporinas, ceftazidima e cefepima. Por outro lado, a maioria (96,4%) foi sensível à colistina. Das cepas analisadas, 92,8% eram multidroga resistentes (MDR), enquanto 3,5% eram extensivamente resistentes (XDR). O gene *bla*_{NDM} foi o mais prevalente, detectado em 51,8% dos isolados, seguido por *bla*_{KPC} (17,8%), *bla*_{IMP} (7,2%) e *bla*_{OXA-48} (5,3%). Além disso, 8,9% dos isolados apresentaram coexistência de *bla*_{NDM/KPC} e 1,8% de *bla*_{KPC/OXA-48}. Com base nos resultados obtidos concluímos que todas as cepas testadas eram resistentes a algum algum antibiótico da classe dos carbapenêmicos, principalmente ao Ertapenem. Dentre os demais antibióticos testados, o mais efetivo foi a Colistina. A maioria das cepas foi coletada do sangue dos pacientes e o setor de hospitalização com maior número de coletas foi o centro cirúrgico. Outro dado alarmante é que, mais da metade dos pacientes internados foram admitidos devido à infecção adquirida na comunidade. Observou-se ainda, uma alta prevalência de genes dos resistência estudados, com destaque para o *bla*_{NDM} e *bla*_{KPC}, sendo encontrada uma relação significativa entre a presença do gene do *bla*_{NDM} e a resistência do microrganismo ao antibiótico Imipenem.

Palavras-chave: Carbapenemases; IRAS, Multirresistentes; Resistência antimicrobiana.

1. Introdução

A resistência a antibióticos é uma preocupação significativa nos sistemas de saúde globais. O Relatório de resistência antimicrobiana da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2022) destacou essa situação como um problema de saúde pública, responsável por aproximadamente 4,95 milhões de mortes, sendo 1,27 milhão diretamente causadas pela resistência bacteriana aos antibióticos (Ranjbar *et al.*, 2024; Algammal *et al.*, 2023).

Entre os mecanismos de resistência bacteriana alguns se destacam, incluindo redução da permeabilidade da membrana externa bacteriana, perda de porinas, alterações nos sítios de ligação dos antibióticos, hiperexpressão de bombas de efluxo e a produção de enzimas betalactamases (Do Prado *et al.*, 2023). O principal mecanismo que impulsiona a rápida disseminação de cepas multirresistentes em ambientes hospitalares é a aquisição de genes de resistência e a subsequente produção de enzimas β -lactamases (Shen *et al.*, 2023).

Essas enzimas estão intimamente associadas ao aumento da resistência aos carbapenêmicos, uma classe crucial de antibióticos usada em casos de infecções graves e persistentes. (Silva *et al.*, 2024). A capacidade das bactérias de adquirir esses genes e sintetizar betalactamases amplia sua sobrevivência em ambientes hospitalares, onde a exposição frequente aos antibióticos cria uma pressão seletiva, facilitando a rápida disseminação de cepas resistentes. Isso representa um desafio substancial para o controle de infecções hospitalares (Zhang *et al.*, 2019).

Atualmente, a bactéria *Klebsiella pneumoniae* Multidroga-resistente (MDR-KP) é considerada um dos microrganismos mais associados a infecções nosocomiais, principalmente em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (Ribeiro; Nascimento, 2023). *K. pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete altamente virulenta, capaz de causar uma variedade de doenças graves em humanos, incluindo pneumonia, abscessos hepáticos, infecções do trato urinário e septicemia, representando um risco significativo à saúde (Baraka *et al.*, 2023). A resistência aos carbapenêmicos nestes microrganismos é mediada principalmente pela presença das enzimas carbapenemases (Vamsi *et al.*, 2022).

Dentre as carbapenemases, as que vem demonstrando importância clínica estão *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC), metalo- β -lactamases, como a Nova Delhi (NDM), Imipinemase metalo- β -lactamases (IMP) e as enzimas hidrolisantes de oxacilina-48 (OXA-48) (Ruiz *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2024). Conhecer as enzimas carbapenemases produzidas pelas cepas circulantes, bem como a detecção dos genes que conferem tal fenótipo de resistência

auxilia na investigação epidemiológica, sendo crucial para um planejamento estratégico, reduzindo assim os surtos dessa infecção (Vamsi *et al.*, 2022).

Nesse contexto, a pandemia da COVID-19 foi uma ameaça mundial que pressionou o aumento da RAM (Resistência Antimicrobiana), com relevantes impactos na epidemiologia de demais doenças infecciosas (Kiffer *et al.*, 2023). No entanto, ainda há uma escassez de dados sobre resistência antimicrobiana e seus mecanismos associados, relacionados ao interstício da pandemia na região Nordeste do Brasil e, especificamente, no estado do Ceará.

Portanto, este estudo teve como objetivo analisar o perfil de sensibilidade antimicrobiana e detectar os genes de resistência *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{OXA-48} em cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos isoladas de pacientes assistidos em um hospital terciário da Região Norte do Ceará entre 2021 e 2022, período no qual ainda se considerava pandêmico para a Covid-19.

2. Material e Métodos

2.1 Aspectos éticos

As amostras utilizadas neste estudo estavam previamente armazenadas no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal do Ceará - UFC *Campus* Sobral, de acordo com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/ISGH) **Parecer Nº 4.313.543** (ver ANEXO 01). Foi solicitada dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ao CEP do ISGH, considerando que o consentimento já havia sido obtido anteriormente.

2.2 Cepas bacterianas e Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA)

Foram analisados neste estudo, um total de 56 isolados clínicos de *K. pneumoniae*, coletados de pacientes assistidos no período de abril/2021 a maio/2022, em um hospital terciário na Região Norte do Estado do Ceará, Brasil. Tais cepas foram previamente submetidas ao teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA) para antibióticos β -Lactâmicos, polimixinas, quinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina e sulfonamidas, por meio do sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), sendo atestada a resistência a pelo menos um antibiótico da classe dos carbapenêmicos.

As cepas foram isoladas de amostras clínicas oriundas de sangue, urina, aspirado

traqueal, feridas e *swab* nasal e identificadas no laboratório de referência São Carlos em Fortaleza, Ceará, Brasil, tendo sido obtidas de pacientes com infecções internados em vários setores hospitalares. Após identificação e verificação do perfil de sensibilidade, os microrganismos foram armazenados em tubos contendo infusão de cérebro e coração (BHI) (Himedia®, Mumbai, Índia) com glicerol a 20% e enviadas ao Laboratório de Microbiologia e Parasitologia (LAMP) da Universidade Federal do Ceará (UFC)/*Campus* Sobral – Brasil para posterior processamento. Posteriormente, foram encaminhadas para o Laboratório de Doenças Infecciosas, Parasitárias de Microbiologia e Reprodução – LASAN na cidade de Teresina Piauí - Brasil, no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), onde foram mantidas a -80°C (Revco, EUA) até a realização das análises genômicas.

2.3 Análise genotípica das cepas

2.3.1 Extração do DNA

Para a extração do DNA, as amostras inicialmente foram reativadas em caldo BHI (Himedia®, Mumbai, Índia) por 24 h a 37 °C. Após crescimento, foram semeadas em ágar MacConkey (por esgotamento) e incubadas por 24 h a 37 °C. Posteriormente, as cepas foram inoculadas em caldo BHI por 24 h a 37 °C. Com o crescimento dos microrganismos em meio líquido, 1 mL de cada amostra foi transportado para microtubos e centrifugados a 1.500 rcf/3min, sendo o sobrenadante descartado. Ao precipitado, foi adicionado 200 µL de tampão 01 (2% triton 100, 1% de SDS, 10mM Tris/HCl (pH 8), 100 mM NaCl e 500 mL de água destilada (q.s.p.), além de 200 µL de fenolclorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), realizando-se agitação em Vortex por 60 segundos, com subsequente centrifugação a 15.900rcf/5 min.

Logo depois, se transferiu o sobrenadante para um novo microtubo, acrescentando-se 200 µL de clorofórmio, prosseguindo-se com centrifugação (15.900rcf/5 min), e transferindo o sobrenadante para outro microtubo.

A precipitação foi realizada com a adição 10 µL de acetato de sódio e 250 µL de álcool 100% gelado e levou-se para o freezer a -70 °C por 1 h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (15.900rcf/20 min), descartando-se o sobrenadante e acrescentado 300 µL de álcool 70%, com posterior centrifugação (15.900rcf/10 min). O sobrenadante foi então descartado novamente e o microtubo passou por processo de secagem em temperatura ambiente. Finalmente o DNA foi ressuscitado com 50 µL do Tampão 01.

Logo após a extração de DNA, foi realizada análise em aparelho NanoDrop™ 2000/2000c (SPECTROPHOTOMETERS), para verificar a presença, integridade e pureza das amostras. Após essa etapa, os tubos seguiram armazenados a -80°C, para posterior realização da PCR, quantificação e eletroforese.

2.3.2 Detecção dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{OXA-48} por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os genes das β-lactamases *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{OXA-48} foram analisados por meio da técnica de Reação em Cadeia Polimerase (PCR), utilizando os primers descritos na **Tabela 1**. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 μL contendo: Master Mix (2,0 μL Taq Pol; 2,5 μL Tampão; 0,5 μL dNTPs; 1,5 μL MgCl₂; 17,5 μL de água milliQ), tendo sido acrescentado 2,0 μL do DNA da amostra e, 1,0 μL de cada primer.

Tabela 1 - Primers para amplificação dos genes

pb= pares de base.

Gene alvo	Sequência de Primers	Amplicon (pb)	Referência
<i>NDM</i>	Forward, 5'-GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC-3' Reverse, 5'-CGGAATGGCTCATCACGATC-3'	621	[1]
<i>KPC</i>	Forward, 5'-TGTCACGTGTATCGCCGTC-3', Reverse, 5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAAACC-3'	1.000	[2]
<i>OXA-48</i>	Forward, 5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3' Reverse, 5'-CATAAGTTAACCCAACCG-3'	438	[3]
<i>IMP</i>	Forward, 5'-GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC-3' Reverse, 5'-CCAAACYACTASGTTATCT-3'	743	[4]

Fonte: 1 - Nithya *et al.*, (2017); 2 - Patil *et al.*, (2023); 3 - Doyle *et al.*, (2012). 4 - Ellington *et al.*, (2007).

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador (Termociclador com bloco para 96 tubos de 0,2 ml, tubos de 0,2 ml em tiras e microplacas PCR 96×0,2 ml) com as seguintes condições de ciclagem (adaptado Vivas *et al.*, 2020): uma desnaturação inicial (94 °C por 5 min); seguidos de 40 ciclos de desnaturação (94 °C por 30 s), anelamento (58 °C para *bla*_{KPC} e 56 °C para *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{OXA-48}, por 30 s e 72 °C por 1 min e 30 s) e uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 min e 30 s.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1,0% com tampão TBE 1% (Tris/Borato/ EDTA), acrescentado do MIDORI *Green Advance* de alta fluorescência (7 μL para 100 μL). A eletroforese foi realizada a 190 volts, 80mA por 40 minutos. A aplicação

no gel de agarose foi feita com 5µl da reação, adicionados de 5µL de tampão. O marcador de peso molecular de 100 pb (pares de base) - Invitrogen, EUA foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos em todas as eletroforeses.

2.4 Análise Estatística

Para avaliar associação entre a presença dos genes de resistência em cepas de *K. pneumoniae* com a resistência aos antibióticos carbapenêmicos foi utilizado o teste Exato de Fisher. O programa utilizado foi o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 20. O valor de p foi fixado em <0,05 para se considerar significância.

3. Resultados

Foram submetidos à análise pelo sistema automatizado VITEK®2 um total de 56 isolados bacterianos obtidos de pacientes internados. As informações sobre a distribuição dos isolados, incluindo espécie bacteriana, gênero, idade, diagnóstico na admissão, setor de hospitalização, sítio de origem e IRAS, estão apresentadas na **Tabela 2**.

K. pneumoniae foi identificada em um percentual igual (50,0%) em pacientes do gênero masculino e feminino. Quanto à faixa etária, a maioria dos casos ocorreu nas faixas de 21 a 40 e de 41 a 60 anos de idade, representando 30,3% do total em cada faixa etária. O diagnóstico de admissão mais frequente foi infecção por COVID-19 (21,0%), seguido de infecção não específica (19,5%) e septicemia (10,8%) (**Tabela 2**).

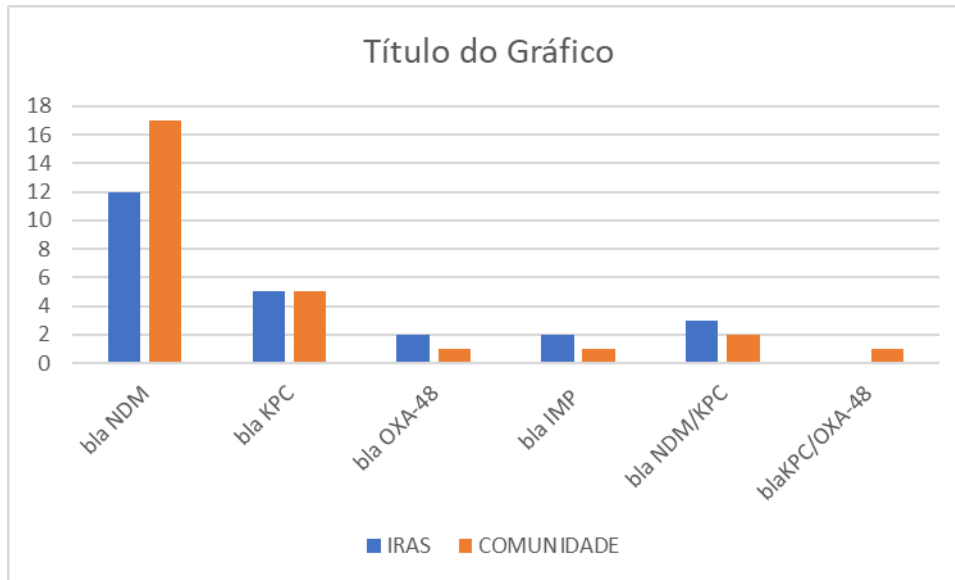
Tabela 2 - Frequência de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos e perfil epidemiológico dos pacientes infectados por esse microrganismo no HRN

Variáveis	n=56	100%
Gênero		
Masculino	28	50,0%
Feminino	28	50,0%
Idade		
0 a 20	6	10,8%
21 a 40	5	9,0%
41 a 60	17	30,3%
61 a 80	17	30,3%
> 80	11	19,6%
Setor de hospitalização		
UTI COVID	4	7,14%
Hospital Campanha	3	5,3%
Clínica COVID	2	3,6%
UTI pediátrica	2	3,6%
Pediatria	1	1,8%
Centro Cirúrgico	13	23,2%
OIA I*	2	3,6%
UTI	9	16,0%
Clínica médica	11	19,7%
UCE**	9	16,06%
Origem da cepa		
Aspirado traqueal	9	16,1%
Sangue	22	42,8%
Urina	16	25,0%
Ferida	8	14,2%
Swab	1	1,9%
IRAS		
Sim	25	44,6%
Não	31	55,4%

* OIA I: Observação intermediária I; **UCE: Unidade de Cuidados Especiais.

Destes 23,2% estavam na área do centro cirúrgico, seguidos pelo setor de clínica médica, com 19,7%. Entre as amostras isoladas analisadas, observou-se que o sangue foi o material de isolamento mais comum (42,8%), seguido pela urina (25,0%) e aspirado traqueal (16,1%). Cerca de 44,6% dos isolados foram identificados como agentes de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e 55,4 % de infecções adquiridas na comunidade (Tabela 2 e Figura 1).

Figura 1. Correlação entre o número de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos e seus respectivos genes de resistência, com IRAS ou infecções adquiridas na comunidade.



Na análise do perfil de sensibilidade antimicrobiana, foi constatado que as cefalosporinas Cefotaxima e Cefepima, e o carbapenêmico Ertapenem registraram a maior taxa de resistência, atingindo 100% das amostras testadas, seguido da quinolona Ciprofloxacina e da penicilina Piperacilina Sódica + Tazobactam Sódico (Pipe-Tazo) ambos com 98,0%. Os antibióticos Meropenem e Imipenem apresentaram 91,0% e 85,7% de resistência, respectivamente (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas de *K. Pneumoniae* (56) resistentes a carbapenêmicos isoladas de pacientes internados no HRN

ANTIMICROBIANOS	R	S	NT
AMICACINA	12,5%	87,5%	-
GENTAMICINA	83,9%	16,1%	-
CEFTO/TAZO	28,6%	-	71,4%
CEFTRIAXONA	66,0%	-	34,0%
CEFTAZIDIMA	100%	-	-
CEFEPIME	100%	-	-
PIPE-TAZO	98,0%	2,0%	-
IMIPENEM	85,7%	14,3%	-

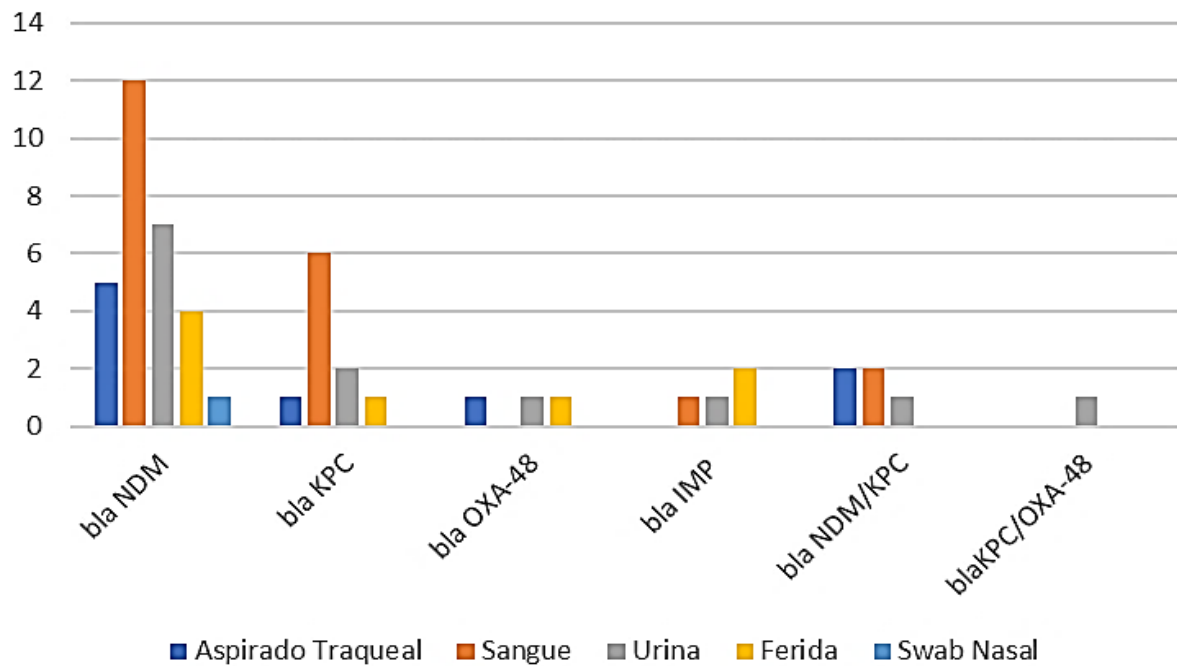
MEROPENEM	91,0%	9,0%	-
CIPROFLOXACINO	98,0%	2,0%	-
AMPICILINA	37,5%	-	62,5%
AZTREONAM	30,3%	1,9%	67,8%
COLISTINA	3,6%	96,4%	-
LEVOFLOXACINA	96,4%	3,6%	-
TIGECICLINA	7,0%	25,0%	68,0%
ERTAPENEM	100%	-	-
TOBRAMICINA	25,0%	7,0%	68,0%
TRIMETO/SUL	89,4%	3,6%	7,0%

*S=sensível; R= resistente; NT= não testado. *Cefto/Tazo= Ceftolozane/Tazobactam; Pipe/Tazo= Piperacilina/Tazobactam; Trimeto/Sul= Trimetoprima/Sulfametazol
Relatórios gerados pelo sistema de identificação automatizado Bacillus Gram-negativo GN, VITEK® 2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France).

Dos resultados obtidos, observou-se que 96,4% das amostras apresentaram sensibilidade à polimixina Colistina. A sensibilidade aos aminoglicosídeos Amicacina e Gentamicina foi de 87,5% e 16,1%, respectivamente, como indicado na **Tabela 3**. Entre as cepas analisadas, foi observado que 96,43% eram multidroga-resistentes (MDR), enquanto duas destas cepas foram identificadas como pandroga resistentes a drogas (PAM), exibindo resistência a todos os antibióticos testados.

A **Figura 2** ilustra a distribuição dos genes de resistência de cepas de *K. pneumoniae* isoladas de diferentes sítios. Os genes de resistência *bla*_{NDM} e *bla*_{KPC} foram recuperados de amostras de sangue na sua maioria (41,3% e 60%, respectivamente), essa associação sugere uma conexão genética com infecções na corrente sanguínea, as quais podem desencadear uma série de complicações clínicas (Martins *et al.*, 2023).

Figura 2. Correlação entre o número de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos e seus respectivos genes de resistência e a origem da amostra em que foram isoladas.



No contexto da análise molecular, observou-se que 92,8% dos isolados foram positivos para a presença de um gene ou mais dos genes analisados neste estudo: o gene *bla*_{NDM} foi detectado em 51,8% das amostras, seguido pelo gene *bla*_{KPC} em 17,8%. Adicionalmente, 8,9% dos isolados continham tanto o gene *bla*_{NDM} como o *bla*_{KPC} (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Correlação da presença dos genes avaliados com a resistência a carbapenêmicos em isolados de *K. pneumoniae* (n=56) de pacientes internados no HRN

Prevalência dos genes de resistência	Resistência antibiótica	Suscetibilidade
<i>bla</i> _{NDM} n=29 (51,8%)	MER n=25 (89,6%)	AK n= 25 (86,02%)
	IMI n=28 (96,05%)	GN n= 5 (17,20%)
	ERT n= 29 (100%)	COL n=29 (100%)
<i>bla</i> _{KPC} n=10 (17,8%)	MER n= 9 (90%)	AK n= 9 (90,0%)
	IMI n= 9 (90%)	GN n= 5 (10,0%)
	ERT n=10 (100%)	COL n=10 (100%)

<i>bla</i> _{OXA-48} n=3 (5,3%)	MER n=3 (100%) IMI n=3 (100%) ERT n=3 (100%)	AK n=2 (66,6%) GN n=1(33,4%) COL n=3 (66,6%)
<i>bla</i> _{IMP} n=4 (7,2%)	MER n= 4(100%) IMI n=3 (75%) ERT n=4 (100%)	AK n=4 (100,0%) GN n= 2 (50,0%) COL n=4(100%)
<i>bla</i> _{NDM} / <i>bla</i> _{KPC} n=5 (8,9%)	MER n=5(100%) IMI n=5 (100%) ERT n=5 (100%)	AK n=2(40,0%) GN n=0 (0,0%) COL n=3(60,0%)
<i>bla</i> _{KPC} / <i>bla</i> _{OXA-48} n=1(1,8%)	MER n=1(100%) IMI n=1(100%) ERT n=1(100%)	AK n=1(100,0%) GN n=0 (0,0%) COL n=1(100,00%)

*MER (Meropenem), IMI (Imipenem), ERT (Ertapenem), AK (Amicacina), GN (Gentamicina), COL (Colistina). Fonte: Dados analisados através do software

O gene *bla*_{OXA-48} foi encontrado em 5,3% das amostras, enquanto 1,8% das amostras albergavam os genes *bla*_{OXA-48} e *bla*_{KPC}. Além disso, foi observado que o gene *bla*_{IMP} estava presente em 7,2% das cepas analisadas. Em 7,2% das cepas que fenotipicamente apresentava resistência a carbapenêmicos não se detectou nenhum dos genes avaliados neste estudo (**Tabela 4**).

Os dados da pesquisa revelaram que os isolados de *K. pneumoniae* que carregavam o gene *bla*_{NDM} apresentaram resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos meropenem (89,6%), imipenem (96,05%) e ao ertapenem (100%), sendo sensíveis a gentamicina (17,2%), amicacina (86,02%) e colistina (100%) (**Tabela 4**).

Ressalta-se na **Tabela 5** o dado que aponta para uma relação estatisticamente significativa entre a presença do gene *bla*_{NDM} presente nas cepas de *K. pneumoniae*, com a resistência ao antibiótico Imipenem.

Tabela 5 – Relação entre a presença do gene *bla*_{NDM} em cepas de *K. pneumoniae* com resistência aos antibióticos Imipenem e Meropenem

Variáveis	Gene <i>bla</i> _{NDM}		Phi	p-valor
	Presente	Ausente		
Imipenem				
Resistente	34	15	0,376	0,009*
Sensível	1	6		
Meropenem				
Resistente	31	16	0,163	0,272
Sensível	4	5		

Fonte: Dados da pesquisa, 2024

*estatisticamente significativo.

Já em 90% dos isolados em que foi detectado o *bla*_{KPC} observou-se resistência aos carbapenêmicos Imipenem e Meropenem e 100% ao Ertapenem, adicionalmente todas essas bactérias apresentaram sensibilidade à Colistina, 90% à Amicacina e 10% à gentamicina. Para este gene, não foi observada uma relação estatisticamente significativa entre sua presença e ao fenótipo de resistência a algum carbapenêmico em específico (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Relação entre a presença do gene *bla*_{KPC} em cepas de *K. pneumoniae* com resistência aos antibióticos Imipenem e Meropenem

Variáveis	Gene <i>bla</i> _{KPC}		Phi	p-valor
	Presente	Ausente		
Imipenem				
Resistente	14	35	0,107	0,661
Sensível	1	6		
Meropenem				
Resistente	14	33	0,155	0,418
Sensível	1	8		

Fonte: Dados da pesquisa, 2024

Considerando os microrganismos que apresentaram de forma simultânea *bla*_{NDM} e *bla*_{KPC} todos apresentaram resistência aos carbapenêmicos (100%), com sensibilidade à Colistina (60%) e à Amicacina (40%). Duas cepas demonstraram resistência a todos os antimicrobianos testados.

Dentre os espécimes que apresentaram o gene *bla*_{OXA-48}, todos apresentaram resistência aos carbapenêmicos, porém, não se observou relação estatisticamente significativa entre a presença desse gene com a resistência a um antibiótico específico. Além disso, 66,6% foram sensíveis à Colistina e à Amicacina e 33% à Gentamicina.

Por outro lado, quando analisamos a cepa que possuía concomitantemente os genes *bla*_{OXA-48} e *bla*_{KPC}, esta apresentou sensibilidade à Colistina e à Amicacina, mantendo a resistência a todos os carbapenêmicos (**Tabela 4**). Já todas as bactérias com o gene *bla*_{IMP} foram sensíveis à Amicacina e à Colistina, sendo que metade delas apresentaram sensibilidade à gentamicina e 25% ao Aztreonam.

Vale ressaltar que neste estudo, 21,4% dos pacientes foram a óbito. Ao fazermos a correlação do diagnóstico, percebemos uma alta taxa de mortalidade em pacientes com presença dos genes estudados, sendo detectado duas amostram pandroga resistentes a drogas (PAM), que apresentaram o pior desfecho clínico, evidenciando-se um elevado grau de virulência do microrganismo.

4. Discussão

Até recentemente, os carbapenêmicos eram amplamente empregados na prática clínica para tratar infecções multirresistentes, devido à sua eficácia potente contra esses microrganismos. No entanto, esses patógenos vêm desenvolvendo mecanismos de resistência após exposição contínua aos carbapenêmicos e outras classes de agentes antimicrobianos (Yang *et al.*, 2020).

Neste estudo, buscamos caracterizar cepas de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e correlacioná-las com variáveis como gênero, idade, local de origem da amostra e a distinção entre infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e infecções comunitárias. Em relação ao gênero, foi observado uma frequência igual de casos no masculino e feminino (50,0%), o que está alinhado com outros estudos conduzidos por Shen *et al.*, (2023) (60,6%) e El-kady *et al.*, (2022) (57%) que demonstrando uma distribuição balanceada quando se compara o gênero. Já em relação ao setor de internação, observou-se que o centro cirúrgico apresentou o maior número de coinfeções por *K. pneumoniae* multirresistentes (23,2%). Isso difere dos achados de Soltani *et al.*, (2022), Chein *et al.*, (2022) e Zahedi *et al.*, (2023), nos quais o setor predominante foi a Terapia Intensiva, apresentando 11,5%, 51,2% e 58,6%, respectivamente. Sendo importante notar que no Brasil, a ocorrência de infecções de sítio

cirúrgico (ISC) em pacientes hospitalizados está entre 14% e 16%, como observado por Borges *et al.*, (2023).

Dos isolados analisados neste estudo, verificou-se que o sangue (42,8%) foi o sítio de isolamento mais comum, seguido pela urina (25,0%) e pelo aspirado traqueal (16,0%). Em um estudo anterior realizado por De Santana *et al.*, (2023), os isolados foram mais frequentemente encontrados na urina (42,9%) e no sangue (28,6%), indicando que a *K. pneumoniae* pode desencadear uma variedade de infecções relacionadas à assistência à saúde, incluindo pneumonia, infecções da corrente sanguínea, infecções em feridas ou locais cirúrgicos, e meningite. Devido à sua prevalência significativa, ela pode ser identificada em diversos locais de isolamento (Lima *et al.*, 2024).

Neste estudo, foi observado que 44,6% dos isolados foram identificados como agentes causadores de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), o que está em consonância com os achados de Grasselli *et al.*, (2021), que encontraram uma taxa semelhante de 46%. A alta taxa de IRAS do nosso estudo se concentrou em pacientes do setor de Centro cirúrgico (36%) e UTI (32%). No Brasil, segundo a Organização Mundial de Saúde, as IRAS são quase três vezes mais prevalentes do que o preconizado que é de 5%. Embora nesse estudo, o isolamento de muitas dessas cepas aconteceu no período da pandemia de COVID-19, justificando o alto índice, visto que nesse período houve um aumento na incidência de IRAS em todo o mundo, devido à sobrecarga dos serviços de saúde (WHO, 2022).

Por outro lado, 55,35% dos espécimes desse estudo foram isolados de pacientes com infecções adquiridas na comunidade, demonstrando disseminação de genes de resistência fora do ambiente hospitalar, o que é preocupante e pode ser atribuído, principalmente, ao uso indiscriminado de antimicrobianos e à pressão seletiva exercida pelo ambiente devido ao consumo desses medicamentos, ou ainda estar relacionado à questão de “saúde única”, uma vez que se pode encontrar microrganismos MDR isolados da alimentos, animais, plantas, e do ambiente (água, ar e solo) (Pereira *et al.*, 2023). Tudo isso pode resultar em falhas terapêuticas e, conseqüentemente, contribuir para o aumento da morbimortalidade e dos custos relacionados à internação (Daza-Cardona *et al.*, 2022).

No que diz respeito ao perfil de sensibilidade, dados semelhantes aos do presente estudo foram encontrados para as cefalosporinas como ceftazidima (CAZ) e cefepima (FEP), onde El-kady *et al.*, (2022), Flores *et al.*, (2020) e Rocha *et al.*, (2019) descreveram uma alta resistência a CAZ (96,7% , 100% e 100% respectivamente) e FEP (85,7% , 100% e 69,4% respectivamente). Esses dados estão em concordância com os achados deste estudo, que apresentou todas as amostras como resistentes a esses antibióticos.

Em relação à resistência aos carbapenêmicos, foi observado que 100% dos isolados eram resistentes ao Ertapenem 91,0% ao meropenem e 85,7% imipenem. Estudos de Osei Sekyere *et al.*, (2024) e Afolayan AO *et al.*, (2023) identificaram resistência ao ertapenem (95,5%) imipenem e meropenem (78,0%), em suas análises. Esses resultados estão em concordância com os achados deste estudo.

O Ertapenem é considerado um marcador eficaz para suspeita da produção de carbapenemases segundo estudos como o de Nordmann *et al.*, (2012), que destacaram a importância da avaliação da sensibilidade ao ertapenem, pois ele é um indicador mais sensível na detecção de carbapenemases. No entanto, de acordo com Vivas *et al.*, (2020), a resistência a esse carbapenêmico não é um indicador direto de produção de carbapenemases, pois outros mecanismos como a redução da permeabilidade podem reduzir a atividade do ertapenem.

Nossos resultados apontam, de modo interessante, que 96,4% dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* apresentaram sensibilidade à Colistina, diferentemente do estudo de Zahedi *et al.*, (2023), que apresentou sensibilidade a esse antibiótico em apenas 0,6% das cepas de *K. pneumoniae* estudadas. Nesse estudo, realizado no Iran (Hospital Milad em Teerã) foram estudadas 162 cepas clínicas de pacientes ambulatoriais. Os autores apontam que essa alta taxa pode estar relacionada ao uso indiscriminado desse antibiótico e mutações genéticas.

Além disso, estudos na literatura indicam que a prevalência do gene *mcr-1*, que confere resistência à Colistina, é menor em cepas de Enterobacteriaceae isoladas de fontes humanas em comparação com cepas isoladas de amostras de animais e alimentos (Elbediwi *et al.*, 2019). Isso sugere que o reservatório do gene *mcr-1* está, pelo menos em parte, nos animais e no ambiente, devido ao amplo uso de colistina na produção animal e na agricultura em geral. A alta sensibilidade de colistina em nosso estudo pode estar associada à proibição no Brasil pelo Ministério da agricultura (MAPA) do uso da colistina como aditivo zootécnico (Pontes, 2023; Daza-Cardona *et al.*, 2022).

É relevante destacar que a maioria das cepas isoladas em nossa pesquisa exibiu um padrão de multirresistência a medicamentos (MDR) em uma proporção de 87,5%, o que está em conformidade com estudos anteriores, como Nakamura-Silva *et al.*, (2022) e Farhadi *et al.*, (2021), que também relataram uma alta incidência de infecções multirresistentes, com taxas de 61,9% e 58% de MDR, respectivamente. O último estudo mencionado apresentou ainda 13% de cepas pandorga resistentes (PAM).

Esse perfil de resistência observado em *K. pneumoniae* está se tornando um problema sério em ambientes hospitalares, uma vez que muitas cepas estão desenvolvendo

resistência à maioria dos antimicrobianos disponíveis. O aumento na taxa desses isolados destaca a importância de selecionar adequadamente um regime antimicrobiano com base nos padrões de suscetibilidade aos antibióticos (Farhadi *et al.*, 2021).

Neste estudo, 91,07% dos casos testados foram positivos para os genes analisados, enquanto 8,9 % apresentaram negatividade para todos os genes investigados. A ausência dos genes de resistência pode ser atribuída ao fato de que essas cepas podem ser resistentes aos carbapenêmicos por meio da produção de carbapenemases mediadas por outros genes que não foram abordado nesta pesquisa (como o *bla_{VIM}*) ou essas bactérias são resistentes aos carbapenêmicos por meio de resistência não mediada pela produção de carbapenemases, como no caso de alteração de sítio receptor, isso pode ser explicado pelo fato de que essas cepas operam por meio de diferentes mecanismos de resistência, como aqueles relacionados à presença ou ausência de porinas/bombas de efluxo (Vivas *et al.*, 2020).

O gene *bla_{NDM}* foi encontrado em 51,8% dos isolados estudados, o que corrobora com os dados de Sarowska *et al.*, (2022), Chen *et al.*, (2022), Vivas *et al.*, (2020) e Shein *et al.*, (2023), que também reportaram uma prevalência do gene *bla_{NDM}* de 82,1%, 78,26%, 50,3% e 72,3%, respectivamente. Em nosso estudo, todas as amostras com o gene *bla_{NDM}* demonstraram resistência ao ertapenem, o que está de acordo com o estudo de Da Rosa *et al.*, (2017), que define o ertapenem como o carbapenêmico mais adequado na triagem de produtores do gene *bla_{NDM}*.

Em relação à sensibilidade todas as cepas com a presença do gene *bla_{NDM}* apresentaram sensibilidade a colistina (100%), diferentemente do estudo de Sarowska *et al.*, (2022) onde a porcentagem de resistência a colistina foi de 60,0% e de Qadi *et al.*, (2021) com 31,6%, esses estudos trazem dados preocupantes, pois enfatizam as possibilidades limitantes da medicina atual, defendendo a antibioticoterapia combinada como opção de manejo quando existe resistência aos aminoglicosídeos com sensibilidade simultânea à colistina ou tigeciclina podendo se usar uma combinação de colistina com tigeciclina e meropenem, sendo uma opção para infecções *K. pneumoniae* MBL/NDM (Paul *et al.*, 2018; Ojdana *et al.*, 2019; Medeiros *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020).

Ainda correlacionando a presença do gene *bla_{NDM}* do nosso estudo com os dados epidemiológicos, observamos que dentre as cepas que albergaram o gene *bla_{NDM}*, 55,17% foram isolados de pacientes do gênero feminino, 20,68% de pacientes que tiveram como diagnóstico infecção não especificada, 41,3% de pacientes com IRAS e 6,8% de indivíduos que tiveram óbito como desfecho final. A presença desse gene foi a única que se mostrou

significativa quando correlacionada com a resistência de um determinado antibiótico carbapenêmico, no caso o Imipenem.

Em relação ao gene *bla*_{KPC}, 17,8% das cepas apresentaram-se positivas, corroborando o estudo de Kiffer *et al.* (2023), estudo realizado ao longo de sete anos no Brasil, foi observada uma mudança na distribuição dos genes de resistência a carbapenêmicos em Enterobacterales entre 2015 e 2022. Durante esse período, houve um aumento significativo na detecção do gene *bla*_{NDM}, passando de 4,1% para 39,4%, enquanto o gene *bla*_{KPC} diminuiu de 74,5% para 55,11%. Esses dados sugerem que o *bla*_{KPC} está em declínio entre as Enterobacterales. No entanto, o aumento na detecção do gene *bla*_{NDM}, conforme demonstrado na presente análise, sugere uma possível substituição das carbapenemases no Brasil. Esse cenário demanda uma atenção cautelosa, pois pode acarretar mudanças significativas nas abordagens de tratamento e controle de infecções por bactérias resistentes a carbapenêmicos (Kiffer *et al.*, 2023).

Em nosso estudo, observamos que as cepas que possuíam o gene *bla*_{KPC}, em relação ao gênero dos pacientes das quais foram isoladas, estavam igualmente distribuídas, com 50% para cada gênero. Além disso, 40% das cepas estavam associadas a infecções inespecíficas ou à COVID-19, 30% estavam relacionadas a IRAS, e 30% resultaram em óbito como desfecho. Adicionalmente, foi observado que 8,9% das cepas apresentaram a coocorrência dos genes *bla*_{NDM} e *bla*_{KPC}, um achado que foi corroborado pelos estudos de Flores *et al.*, (2020). Isso fortalece a ideia de que, ao longo das décadas, a resistência a carbapenêmicos em *K. pneumoniae* tem sido tipicamente causada pelo surgimento de carbapenemases transmissíveis, como KPC e NDM (Kiaei *et al.*, 2019). Vale ressaltar que a maioria das bactérias produtoras de NDM também carrega uma diversidade de outras resistências, incluindo diferentes carbapenemases como KPC, OXA-48 e VIM (Flores *et al.*, 2020) e que as amostras PAM (3,5%) albergavam ambos genes.

Em relação ao gene *bla*_{OXA-48}, foi detectado em 5,3% das análises, contradizendo estudos como os de Soltani *et al.*, (2022), Odewale *et al.*, (2023) e Baraka *et al.*, (2023), que relataram a presença do gene em 78,7%, 28,9% e 100%, respectivamente. Essa disparidade pode estar ligada ao fato de que as carbapenemases OXA-48 estão entre as enterobactérias mais prevalentes em grande parte da Europa, Norte da África e Oriente Médio (Boydse *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2024). Em nosso estudo, as amostras carreadoras de *bla*_{OXA-48} apresentaram resistência de alto nível à piperacilina-tazobactam, o que pode fornecer indicadores úteis em um fluxo de trabalho de laboratório clínico para a detecção de produção de enzimas OXA-48

(Boydse *et al.*, 2022). Adicionalmente, uma cepa foi identificada como portadora dos genes *bla*_{OXA-48} e *bla*_{KPC}.

A presença do gene *bla*_{IMP} foi de 7,2%. Essa proporção menor pode ser justificada pelo fato de que as enzimas KPC, OXA-48 e NDM são as principais carbapenemases em cepas de *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos (CRKP). A prevalência do gene *bla*_{IMP} em *Klebsiella spp.* são relativamente baixas (Liu *et al.*, 2024).

Por fim, consideramos que os dados provenientes deste estudo podem ser valiosos para a obtenção de informações essenciais no controle da propagação desses patógenos, o que tem um impacto direto nos pilares da segurança do paciente e na melhoria da qualidade da assistência no estado do Ceará. Além disso, os resultados contribuem para uma constante vigilância epidemiológica de bactérias resistentes (e dos genes de resistência), seja na comunidade ou em hospitais do nosso país.

5. Conclusão

Neste estudo, todas as cepas testadas eram resistentes a algum algum antibiótico da classe dos carbapenêmicos, principalmente ao Ertapenem. Dentre os demais antibióticos testados, o mais efetivo foi a Colistina. A maioria das cepas foi coleada do sangue dos pacientes e o setor de hospitalização com maior número de coletas foi o centro cirúrgico. Outro dado alarmante é que, mais da metade dos pacientes internados foram admitidos devido a infecção adquirida na comunidade. Observou-se ainda, uma alta prevalência de genes dos resistência estudados, com destaque para o *bla*_{NDM} e *bla*_{KPC}, sendo encontrada uma relação significativa entre a presença do gene do *bla*_{NDM} e a resistência do microrganismo ao antibiótico Imipenem.

Conflito de interesses

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

Referências

- AFOLAYAN, Ayorinde O. *et al.*, Three *Klebsiella pneumoniae* lineages causing bloodstream infections variably dominated within a Greek hospital over a 15 year period. **Microbial Genomics**, v. 9, n. 8, p. 001082, 2023.
- ALGAMMAL, Abdelazeem *et al.*, Emerging multidrug-resistant bacterial pathogens “superbugs”: A rising public health threat. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1135614, 2023.
- BARAKA, Kholoud *et al.* Genotyping and molecular investigation of plasmid-mediated carbapenem resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in Egypt. **AIMS microbiology**, v. 9, n. 2, p. 228, 2023.
- BORGES, Felipe Valadão *et al.* Infecção por superbactérias no centro cirúrgico e na Unidade de Terapia Intensiva: uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 1, p. e4212139453-e4212139453, 2023.
- BOYDSE, Holmes A, *et al.*, β -lactamases semelhantes a OXA-48: epidemiologia global, opções de tratamento e pipeline de desenvolvimento. **Agentes Antimicrobianos Quimioterapia** 66:e00216-22. 2022.
- CHEN, D. *et al.*, Epidemiology of resistance of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* to ceftazidime-avibactam in a Chinese hospital. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 1, p. 237-243, 2022.
- DA ROSA, Tamine Jandrey. New Delhi metalobetalactamase (NDM): uma revisão. **RBAC**, v. 49, n. 1, p. 36-40, 2017.
- DAZA-CARDONA, Erika Alexandra *et al.*, mcr-mediated colistin resistance in South America, a One Health approach: a review. **Reviews and Research in Medical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. e119-e136, 2022.
- DE SANTANA, Polinny Suanny Fragoso *et al.*, Ocorrência de *Klebsiella pneumoniae* extensivamente Resistente (xdr) produtoras de carbapenemases em um hospital terciário em Recife, pernambuco. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, p. 103401, 2023.
- DOYLE, Diana *et al.*, Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877-3880, 2012.
- DO PRADO, Giovanna Stati Batista *et al.*, MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS: NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 9, n. 7, p. 1920-1930, 2023.
- ELBEDIWI, Mohammed *et al.*, Global burden of colistin-resistant bacteria: mobilized colistin resistance genes study (1980–2018). **Microorganisms**, v. 7, n. 10, p. 461, 2019.
- EL-KADY, Rania Abd El-Hamid; ELBAIOMY, Mohamed Ali; ELNAGAR, Rasha Mokhtar. Molecular mechanisms mediating ceftazidime/avibactam resistance amongst carbapenem-

- resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from cancer patients. **Infection and Drug Resistance**, p. 5929-5940, 2022.
- ELLINGTON, Matthew J. *et al.*, Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 321-322, 2007.
- FARHADI, Mojgan *et al.*, High frequency of multidrug-resistant (MDR) *Klebsiella pneumoniae* harboring several β -lactamase and integron genes collected from several hospitals in the north of Iran. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 20, p. 1-9, 2021.
- FLORES, Claudia *et al.*, Genetic relatedness of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* co-occurring VIM, KPC, and OXA-48 enzymes from surveillance cultures from an intensive care unit. **Microbial drug resistance**, v. 26, n. 10, p. 1219-1226, 2020.
- GRASSELLI, Giacomo *et al.*, Hospital-acquired infections in critically ill patients with COVID-19. **Chest**, v. 160, n. 2, p. 454-465, 2021.
- KIAEI, Somayeh *et al.*, Emergence of co-existence of bla NDM with rmtC and qnrB genes in clinical carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in burning center from southeast of Iran. **Folia microbiologica**, v. 64, p. 55-62, 2019.
- KIFFER, Carlos RV *et al.*, A 7-year Brazilian national perspective on plasmid-mediated carbapenem resistance in enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* complex and the impact of the coronavirus disease 2019 pandemic on their occurrence. **Clinical Infectious Diseases**, v. 77, n. Supplement_1, p. S29-S37, 2023.
- LIMA, Mariana Alves *et al.*, Infecções hospitalares associadas a *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (kpc): uma revisão. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 1, p. 3268-3280, 2024.
- LIU, Congcong *et al.*, Phenotypic and genomic characteristics of clinical IMP-producing *Klebsiella spp.* Isolates in China. **Communications Medicine**, v. 4, n. 1, p. 25, 2024.
- MARTINS, Lamartine Rodrigues *et al.*, GENES PARA CARBAPENEMASES BLAKPC E BLANDM EM ISOLADOS DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE PROVENIENTES DE SÍTIOS DE INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO DE PACIENTES DE UM HOSPITAL PÚBLICO DE RECIFE-PE. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, p. 103369, 2023.
- MEDEIROS, Gregory Saraiva *et al.*, Combination therapy with polymyxin B for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. **International journal of antimicrobial agents**, v. 53, n. 2, p. 152-157, 2019.
- NAKAMURA-SILVA, Rafael *et al.*, Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: A retrospective study in Manaus, Brazil. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 4, p. 202, 2022.
- NITHYA, N. *et al.*, Analysis of beta-lactamases, blaNDM-1 phylogeny & plasmid replicons in multidrug-resistant *Klebsiella spp.* from a tertiary care centre in south India. **Indian Journal of Medical Research**, v. 146, n. Suppl 1, p. S38-S45, 2017.

NORDMANN, Patrice *et al.*, Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 5, p. 432-438, 2012.

ODEWALE, Gbolabo *et al.* Genotypic Determination of Extended Spectrum β -Lactamases and Carbapenemase Production in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Southwest Nigeria. ***Infectious Disease Reports***, v. 15, n. 3, p. 339-353, 2023.

OJDANA, Dominika *et al.*, Activity of ceftazidime-avibactam alone and in combination with ertapenem, fosfomicin, and tigecycline against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. ***Microbial Drug Resistance***, v. 25, n. 9, p. 1357-1364, 2019.

OSEI SEKYERE, John *et al.*, Molecular Epidemiology of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, and *Escherichia coli* outbreak among neonates in Tembisa Hospital, South Africa. ***Frontiers in Cellular and Infection Microbiology***, v. 14, p. 1328123, 2024.

PATIL, Praful S. *et al.*, Molecular Detection of Carbapenem Resistance in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Tertiary Care Hospital. ***Journal of Pure & Applied Microbiology***, v. 17, n. 2, 2023.

PAUL, Mical *et al.*, Colistin alone versus colistin plus meropenem for treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: an open-label, randomised controlled trial. ***The lancet Infectious diseases***, v. 18, n. 4, p. 391-400, 2018.

PEREIRA DE ARAÚJO NETO, Pedro *et al.*, RESISTÊNCIA BACTERIANA CONSECUTIVA DO USO INDISCRIMINADO DE ANTIBIÓTICOS: REVISÃO INTEGRATIVA. ***Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR***, v. 27, n. 5, 2023.

PONTES, Leilane da Silva *et al.*, **Avaliação fenotípica e genotípica de bactérias resistentes às polimixinas isoladas de Swab de cloaca de frangos em granjas do Estado do Rio de Janeiro**. 2023. Tese de Doutorado.

QADI, Mohammad *et al.*, Colistin resistance among Enterobacteriaceae isolated from clinical samples in Gaza Strip. ***Canadian journal of infectious diseases and medical microbiology***, v. 2021, p. 1-6, 2021.

RA RANJBAR, Reza; ALAM, Mostafa. Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. ***Evidence-Based Nursing***, v. 27, n. 1, p. 16-16, 2024.

RIBEIRO, Davi; NASCIMENTO, Júlia. Prevalência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva (BIOMEDICINA). ***Repositório Institucional***, v. 1, n. 1, 2023.

ROCHA, F. R. *et al.* High Frequency of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Strains Isolated from a Teaching Hospital in Brazil. ***Microbial Drug Resistance***, v. 25, n. 6, 2019.

RUIZ, J. *et al.*, Antimicrobial stewardship programme in critical care medicine: a prospective interventional study. ***Medicina intensiva***, v. 42, n. 5, p. 266-273, 2018.

SAROWSKA, Jolanta *et al.*, Occurrence and characteristics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Poland—A single centre study. **Pathogens**, v. 11, n. 8, p. 859, 2022.

SHEN, Meijing *et al.*, Antimicrobial resistance patterns, sequence types, virulence and carbapenemase genes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from a tertiary care teaching hospital in Zunyi, China. **Infection and Drug Resistance**, p. 637-649, 2023.

SILVA, Martinair Santana da *et al.*, Current Global Occurrence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) Infections in Hospitalized Patients: A Literature Review. **Archives of Current Research International**, v. 24, n. 5, p. 113-123, 2024.

SOLTANI, Elghar *et al.*, An alliance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with precise capsular serotypes and clinical determinants: A disquietude in hospital setting. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2022, 2022.

VAMSI, Sreeja K. *et al.*, Phenotypic and genotypic detection of carbapenemase production among gram negative bacteria isolated from hospital acquired infections. **Saudi Medical Journal**, v. 43, n. 3, p. 236, 2022.

VIVAS, Roberto *et al.*, Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-and New Delhi metallo-beta-lactamase-positive *K. pneumoniae* in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.53, p. e20200064, 2020.

WANG, Lei *et al.*, Triple versus double therapy for the treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 487865, 2020.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2022**. Geneva: World Health Organization, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702>. Acesso em: 03 jan. 2024.

YANG X, Yu Y, Xu J, *et al.*, Clinical evolution and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a retrospective, single-center observational study. **Respir Med Lancet**. 2020; 8:475–481. doi:10.1016/S2213-2600(20)30079-5.

ZAHEDI BIALVAEI, abed *et al.*, Prevalence and epidemiological investigation of mgrB- dependent colistin resistance in extensively drug resistant *Klebsiella pneumoniae* in Iran. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 10680, 2023.

ZHANG, Di *et al.*, Antibiotic consumption versus the prevalence of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria at a tertiary hospital in China from 2011 to 2017. **Journal of infection and public health**, v. 12, n. 2, p. 195-199, 2019.

ANEXO 01



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÔMICA ASSOCIADA À RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ENTEROBÁCTERIAS E *Pseudomonas* sp. ISOLADAS DE PACIENTES ASSISTIDOS NUM HOSPITAL DE GRANDE PORTE NO NORTE DO CEARÁ

Pesquisador: CARLOS VICTOR FONTENELE PINHEIRO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 35097420.7.0000.5684

Instituição Proponente: INSTITUTO DE SAUDE E GESTAO HOSPITALAR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.313.543



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÔMICA ASSOCIADA À RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ENTEROBÁCTERIAS E *Pseudomonas* sp. ISOLADAS DE PACIENTES ASSISTIDOS NUM HOSPITAL DE GRANDE PORTE NO NORTE DO CEARÁ

Pesquisador: CARLOS VICTOR FONTENELE PINHEIRO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 35097420.7.0000.5684

Instituição Proponente: INSTITUTO DE SAUDE E GESTAO HOSPITALAR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.313.543

REFERENCIAS

- BARAKA, Kholoud *et al.*, Genotyping and molecular investigation of plasmid-mediated carbapenem resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in Egypt. **AIMS microbiology**, v. 9, n. 2, p. 228, 2023.
- DO PRADO, Giovanna Stati Batista *et al.*, MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS: NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 9, n. 7, p. 1920-1930, 2023.
- INSTITUTO DE SAÚDE E GESTÃO HOSPITALAR. Hospital Regional Norte, 2022. Disponível em: <https://isgh.org.br/hospital-regional-norte>. Acesso em: 03 mar. 2024.
- MARQUES, Vitor André Pontes *et al.*, DIVERSIDADE MICROBIANA E DESAFIOS PARA ANTIBIOTICOTERAPIA EM AMBIENTE HOSPITALAR. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 9, n. 9, p. 4280-4290, 2023.
- PEREIRA DE ARAÚJO NETO, Pedro *et al.*, RESISTÊNCIA BACTERIANA CONSECUTIVA DO USO INDISCRIMINADO DE ANTIBIÓTICOS: REVISÃO INTEGRATIVA. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 27, n. 5, 2023.
- KIFFER, Carlos RV *et al.*, A 7-year Brazilian national perspective on plasmid-mediated carbapenem resistance in enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* complex and the impact of the coronavirus disease 2019 pandemic on their occurrence. **Clinical Infectious Diseases**, v. 77, n. Supplement_1, p. S29-S37, 2023.
- ROCHA, F. R. *et al.* High Frequency of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Strains Isolated from a Teaching Hospital in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 6, 2019.
- RUIZ, J. *et al.*, Antimicrobial stewardship programme in critical care medicine: a prospective interventional study. **Medicina intensiva**, v. 42, n. 5, p. 266-273, 2018.
- SHEN, Meijing *et al.*, Antimicrobial resistance patterns, sequence types, virulence and carbapenemase genes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from a tertiary care teaching hospital in Zunyi, China. **Infection and Drug Resistance**, p. 637-649, 2023.
- SILVA, Martinair Santana da *et al.*, Current Global Occurrence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) Infections in Hospitalized Patients: A Literature Review. **Archives of Current Research International**, v. 24, n. 5, p. 113-123, 2024.
- VAMSI, Sreeja K. *et al.*, Phenotypic and genotypic detection of carbapenemase production among gram negative bacteria isolated from hospital acquired infections. **Saudi Medical Journal**, v. 43, n. 3, p. 236, 2022.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2022**. Geneva: World Health Organization, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702>. Acesso em: 03

jan. 2024.

ZHANG, Di *et al.*, Antibiotic consumption versus the prevalence of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria at a tertiary hospital in China from 2011 to 2017. **Journal of infection and public health**, v. 12, n. 2, p. 195-199, 2019.