



**UNIVERSIDADE DE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

PATRÍCIA FRANCISCA GAMA DA SILVA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTÊNCIA
À POLIMIXINA B EM *Klebsiella pneumoniae* PROVENIENTE DE ISOLADOS DE
RECIFE, PERNAMBUCO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

**RECIFE-PE
2023**

PATRÍCIA FRANCISCA GAMA DA SILVA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTÊNCIA
À POLIMIXINA B EM *Klebsiella pneumoniae* PROVENIENTE DE ISOLADOS DE
RECIFE, PERNAMBUCO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Trabalho de conclusão de curso, no formato de artigo científico, apresentado à coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Anna Carolina Soares Almeida.

RECIFE-PE
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586d

DA SILVA, PATRICIA FRANCISCA GAMA

DIVERSIDADE GENÉTICA E MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B EM *Klebsiella pneumoniae* PROVENIENTE DE ISOLADOS DE RECIFE, PERNAMBUCO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA / PATRICIA FRANCISCA GAMA DA SILVA. - 2023.

44 f.

Orientador: ANNA CAROLINA SOARES ALMEIDA.

Coorientador: MICHELLY MARIA PERREIRA OLIVEIRA.

Inclui referências e apêndice(s).

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2023.

1. Sistemas de dois componentes. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Epidemiologia molecular . 4. Disseminação clonal. I. ALMEIDA, ANNA CAROLINA SOARES, orient. II. OLIVEIRA, MICHELLY MARIA PERREIRA, coorient. III. Título

CDD 574

PATRÍCIA FRANCISCA GAMA DA SILVA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTÊNCIA
À POLIMIXINA B EM *Klebsiella pneumoniae* PROVENIENTE DE ISOLADOS DE
RECIFE, PERNAMBUCO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Trabalho de conclusão de curso, no formato de artigo científico, apresentado à coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Anna Carolina Soares Almeida
Co-orientadora: Michelly Maria Pereira e Oliveira

Data da aprovação: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa Dra Anna Carolina Soares Almeida
Presidente da Banca

Ma. Crisvânia Pedrosa dos Santos Nascimento
Membro externo

Me. Rodrigo Tenório Gomes Pereira
Membro externo

Dra. Ana Caroline Oliveira Ribeiro Alves
Suplente

Ao meu filho, que motiva diariamente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu filho, João, por ser meu combustível diário, que me motiva a buscar o melhor para nós dois e por despertar em mim o desejo de tentar ser uma pessoa melhor todos os dias. Amo-te infinitamente!

Aos meus pais, Ana e Marcelo, pelos valores que me foram passados enquanto estive sob os cuidados de vocês, sem isso eu não teria me tornado a mulher que sou. Painho, obrigada por todo esforço e por me incentivar a seguir a área que eu gostasse, por me mostrar o quanto a educação é importante na vida de uma pessoa. Mainha, obrigada por todo apoio como mãe, avó e mulher, vê teu esforço me motiva. Mesmo sem dizer constantemente, amo vocês.

À minha irmã, melhor amiga e maior incentivadora, Carol, sou imensamente grata por ter você em minha vida, por compartilharmos nossa caminhada e sermos portos seguros uma da outra, obrigada por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava, amo você e Renato. Nato, sou grata ao universo por ter colocado você em nossas vidas, estar com vocês é sempre leve e renovador, muito obrigada por todo carinho e apoio de sempre.

Aos meus tios, em especial tio Miguel, a quem tenho como um pai. Tio, obrigada por tudo, por acreditar que eu posso ir muito além, pelo incentivo e por todo amor que o senhor me deu desde que saí da maternidade e fui direto para casa do senhor e de tia. Aos meus primos, que sempre torceram por mim, e me incentivaram, obrigada por me tirarem de casa, vocês não sabem o quanto isso me fez bem, obrigada por todo carinho.

Às minhas amigas, Luana, Themis, Cíntia e Aninha, que estiveram comigo nos momentos mais difíceis da minha vida, por me ouvirem, me incentivarem e por estarem sempre na torcida. Lu, meu amor, obrigada por todo amor, cuidado, parceria e por desejar meu melhor nesses últimos 18 anos. Themis, obrigada por ser amiga no bom e no ruim, por me dar o colo quando precisei chorar e me incentivar a seguir. Cíntia e Aninha, sempre serei grata ao universo por ter colocado vocês na minha vida e por tudo que vocês fizeram por mim e por João. Vocês são irmãs que a vida me deu, amo muito cada uma de vocês!

Aos amigos que a graduação me deu, Helen e Joel, obrigada por fazerem a vida acadêmica ser mais leve, por compartilharem os medos, dúvidas e anseios comigo, por acreditarem em mim quando eu me sentia incapaz e insegura, amo vocês. Helen, obrigada por todo incentivo, por não ter soltado minha mão na pandemia, obrigada por ter me

ouvido quando precisei conversar e chorar no meio do caos que foi 2020 e 2021. Joel, obrigada por me incentivar, por me fazer sorrir e por acreditar em mim.

Ao grupo de pesquisa que me recebeu e compartilhou a bancada comigo, à Carol pela oportunidade, por todo conhecimento compartilhado comigo e por participar da minha formação profissional. Caroline, obrigada por ter me acolhido quando cheguei no genoma e por ter compartilhado comigo seus conhecimentos e experiência. Paula, obrigada por ser nossa enciclopédia ambulante e por compartilhar comigo toda sua expertise. Michelly, obrigada por ter compartilhado comigo seus conhecimentos e experiência, por me orientar nessa etapa da minha vida e por ser a parceira de perrengues científicos que a vida acadêmica me proporcionou conhecer e trabalhar. A todo grupo, meus agradecimentos pela divisão de bancada, conhecimento, cafês e risadas no decorrer dessa jornada.

Ao grupo PET Biologia - UFRPE/Sede, aos tutores e aos amigos que fiz, a tudo que aprendi e ao quanto o programa me permitiu viver experiências que tornou minha experiência acadêmica mais enriquecedora e diferenciada, tanto no âmbito pessoal, profissional e cidadã. Eu nunca mais fui a mesma depois de ter entrado no grupo, vocês plantaram em mim um amor pela extensão, estar no grupo me fez mudar de pensamento quanto as minhas obrigações quanto cidadã e futura profissional. Uma vez PETiano, sempre PETiano.

In memoriam, gostaria de agradecer a dona Célia e Seu João por todo amor, por terem sido os melhores avós que eu poderia ter. A dona Célia pelo exemplo de mulher determinada, trabalhadora, destemida, íntegra que eu almejo ser um dia. Queria muito que vocês estivessem aqui agora, mas tudo tem seu tempo. Amarei vocês imensamente até o fim dos meus dias.

“Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas”.

(Friedrich Nietzsche)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas, moleculares e fenotípicas dos isolados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> resistentes à polimixina B.....	20
--	-----------

SUMÁRIO

ARTIGO - DIVERSIDADE GENÉTICA E MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B EM <i>Klebsiella pneumoniae</i> PROVENIENTE DE ISOLADOS DE RECIFE, PERNAMBUCO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.....	10
RESUMO.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
METODOLOGIA.....	15
RESULTADOS.....	17
DISCUSSÃO.....	24
CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS.....	30
ANEXO A - NORMAS DA REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ.....	36

ARTIGO

**DIVERSIDADE GENÉTICA E MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTÊNCIA
À POLIMIXINA B EM *Klebsiella pneumoniae* PROVENIENTE DE ISOLADOS DE
RECIFE, PERNAMBUCO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Segundo as normas da revista científica Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

DIVERSIDADE GENÉTICA E MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B EM *Klebsiella pneumoniae* PROVENIENTE DE ISOLADOS DE RECIFE, PERNAMBUCO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Patrícia Francisca Gama da Silva¹; Michelly Maria Pereira e Oliveira²; Anna Carolina Soares Almeida¹

¹ Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco; ² Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco

RESUMO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tornou-se um problema de saúde pública nos últimos anos, devido às limitações terapêuticas de combate a essas infecções. Com a necessidade de tratar as infecções causadas por esses patógenos, a polimixina B, droga de último recurso, foi reintroduzida na clínica médica. Visando entender quais mecanismos estão associados ao fenótipo de resistência à polimixina B e como tem ocorrido a disseminação dessa resistência, esta revisão sistemática reuniu achados de outros estudos que investigaram isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes à polimixina B provenientes de hospitais da cidade do Recife, Pernambuco. Os dados obtidos revelam que existe uma correlação da resistência à polimixina B associada à interrupção do gene *mgrB*, regulador negativo de PhoQ. Quanto aos genes envolvidos nos sistemas de dois componentes, o gene *pmrB* foi o que apresentou prevalência de mutações. Além da resistência à polimixina B, todos os isolados apresentam outros genes de resistência associados a uma variedade de drogas, sendo o mais incidente os genes de resistência aos β -lactâmicos: *bla_{KPC}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*. A associação desses isolados com base nos perfis filogenéticos nos permitiu observar a ocorrência de disseminação policlonal, com prevalência das ST855 e ST423, presentes em mais de um recorte temporal analisado.

Palavras-chaves: Sistema de dois componentes; Resistência antimicrobiana; Epidemiologia molecular; Disseminação clonal.

INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae é uma enterobactéria Gram-negativa que frequentemente apresenta um fenótipo de multidroga resistente (MDR) (Martin & Bachman, 2018), sendo reconhecida como “uma ameaça à saúde humana” pelo *Center for Diseases Control* e pela Organização Mundial de Saúde, por apresentar alta taxa de morbimortalidade, como nos casos de pneumonia, infecções do trato urinário e infecções da corrente sanguínea. Além disso, isolados de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) estão amplamente distribuídos ao redor do mundo, estando associados a surtos de resistência relatados globalmente (Nass *et al.*, 2005; Leavitt *et al.*, 2007). A alarmante ocorrência de resistência aos fármacos disponíveis na antibioticoterapia tem limitado o tratamento das infecções causadas por esses patógenos. Essa limitação reacendeu o uso das polimixinas como alternativa terapêutica de controle das infecções causadas por enterobactérias, incluindo *K. pneumoniae* (Olaitan *et al.*, 2014; Ortwine, *et al.*, 2015; Martin & Bachman, 2018). As polimixinas (polimixina B e colistina) são antimicrobianos usados no tratamento de pacientes com infecções causadas por bactérias resistentes aos carbapenêmicos. Ambos possuem mecanismo de ação semelhante, apesar das diferenças em sua composição química, farmacocinética e via parenteral de administração (Zavascki *et al.*, 2010). Esse grupo de fármacos são polipeptídeos catiônicos que possuem afinidade pelo lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa (ME) e membrana interna (MI) de bactérias Gram-negativas, sendo essa interação a causa da desestabilização das membranas, resultando na lise celular (Velkov *et al.*, 2013).

A exposição à polimixina B é responsável por ativar os sistemas globais de regulação de dois componentes (TCS) presentes na membrana interna de bactérias os quais são capazes de perceber alterações no meio e desencadear uma resposta frente a presença desse antimicrobiano (Schmidl *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2016). Em *K. pneumoniae*, os TCS mais

relatados são PmrA/PmrB e PhoP/PhoQ, esses sistemas são compostos por duas proteínas, sendo uma sensora histidina-quinase (PmrB e PhoQ) e outra a que atua como reguladora de resposta (PmrA e PhoP) na cascata de ativação de genes de resposta (West *et al.*, 2001). Esses sistemas atuam por meio da ativação de genes, os quais conferem mecanismos de resistência na presença do antimicrobiano polimixina B. A modificação do lipopolissacarídeo nas membranas é um dos principais mecanismos associados à resistência à polimixina B, por meio da adição de fosfoetanolamina (PEtN) ou do 4-amino-4desoxi-L-arabiniose (L-Ara4N) (Raetz *et al.*, 2007; Hawley *et al.*, 2008; Olaitan *et al.*, 2014), resultando numa alteração covalente das cargas da membranas externa e interna, que subsequentemente dificulta a interação fármaco-membrana responsável pela lise da célula bacteriana (Akshay *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2016).

Em *K. pneumoniae* os sistemas de dois componentes responsáveis pela resistência à polimixina B são PhoPQ, PmrAB e CrrAB. Sabe-se que o TCS PhoPQ contribui para a resistência à polimixina B, desencadeando uma resposta direta ou indiretamente por meio do TCS PmrAB via proteína PmrD, ativando a transcrição de genes responsáveis pela modificação do LPS (Kox *et al.*, 2000 ; Kato *et al.*, 2003 ; Winfield & Groisman, 2004). Uma vez ativado, o sistema PmrAB desencadeia uma resposta via operon *arnBCADTEF* (Groisman *et al.*, 2016; Rao & Igoshin, 2021) . A ativação do TCS PmrAB leva à regulação positiva do *pmrCAB* e *arnBCADTEF - pmrE* (também chamado de *pmrHFIJKLM-ugd*), operons que mediam a síntese e transferência de PEtN e L-Ara4N, respectivamente, para o lipídio A (Raetz *et al.*, 2007 ; Yan *et al.*, 2007; Gun *et al.*, 2008). Um terceiro sistema de dois componentes, CrrAB também está associado ao contexto da resistência à polimixina B em *K. pneumoniae*. Foi relatado que mutações no gene *crrB* aumentam a expressão de *crrC*, que regula positivamente o sistema PmrAB, resultando assim em transcrição elevada do gene *pmrC* e do operon *pmrHFIJKLM* (Cheng *et al.*, 2016), que também pode ser ativado

diretamente pelo sistema CrrAB, resultando na modificação do lipídio A (McConville *et al.*, 2020). Externamente aos sistemas de dois componentes, o gene *mgrB*, atua como regulador negativo do sistema PhoPQ, mais precisamente sobre PhoP, que quando inativada leva à resistência à polimixina B (Olaitan *et al.*, 2014).

Além da resistência associada aos mecanismos desencadeados pelos sistemas de dois componentes, há a ocorrência de genes relacionados à resistência de várias classes de antimicrobianos como aos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, sulfonamidas, entre outros (Koutsoumanis *et al.*, 2021). Esses genes que conferem resistência aos antimicrobianos, em alguns casos, podem estar associados a elementos genéticos móveis, como sequências de inserção e plasmídeos. O gene *mcr* é um gene plasmidial que confere resistência à colistina (polimixina E), estando associado a uma rápida transmissibilidade de resistência antimicrobiana por via plasmidial (Liu *et al.*, 2016).

No contexto da resistência bacteriana aos antimicrobianos, saber seus determinantes, ocorrência e fatores envolvidos na sua disseminação são possíveis através da caracterização molecular e fenotípica, que auxiliam na identificação de clones e de linhagens filogeneticamente correlacionadas, permitindo entender a dinâmica dispersão desses isolados.

A técnica de Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos Loci (*Multilocus Sequence Typing*, MLST) emprega o sequenciamento do DNA de sete genes constitutivos (*abcZ*, *adK*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* e *pgm*) (Maiden *et al.*, 1998). Esse método permite a caracterização dos isolados ao sequenciar as variações presentes na sequência nucleotídica de fragmentos internos dos genes constitutivos (Perez-Losada *et al.*, 2013). Os isolados são caracterizados pelos alelos de cada um dos sete loci, formando um perfil alélico, também denominado de sequência tipo, do inglês Sequence Type (ST) (Maiden *et al.*, 1998; Urwin & Maiden, 2003). Cada ST recebe um número arbitrário que é correspondente a um tipo eletroforético (ET) (Brehony *et al.*, 2007). Quando um grupo de STs compartilha até quatro alelos em comum

com um ST central têm-se um complexo clonal (CC). O ST central é o suposto genótipo ancestral, ou seja, aquele em que os outros genótipos no complexo são descendentes e o complexo é então nomeado a partir desse ST (Maiden *et al.*, 1998; Urwin & Maiden, 2003).

A resistência à polimixina B é considerada alarmante em *K. pneumoniae*, apresentando altas taxas entre os isolados produtores de carbapenemase relatados em estudos de vigilância e casos clínicos em todo o mundo (Gales *et al.*, 2011; Jeannot *et al.*, 2017; Poirel *et al.*, 2017). Alguns clones de alto risco mais disseminados mundialmente também foram encontrados no Brasil, sendo mais incidentes os ST11, ST258 e ST345 (Bowers *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2018). O estudo de Rodrigues (2019), revelou alta diversidade clonal entre os isolados, incluindo nove ST diferentes (ST13, ST70, ST273, ST449, ST323, ST2084, ST1075, ST1298, ST2687) que não foram associados anteriormente à resistência à polimixina B no Brasil, revelando a diversidade clonal existente. Surtos com *K. pneumoniae* produtores de KPC e resistentes à polimixina B estão atribuídos principalmente ao complexo clonal 258 (CC258), que é composto por clones epidêmicos amplamente disseminados em vários países do mundo (Poirel *et al.*, 2017), dos quais alguns ST associados a surtos epidêmicos no mundo também são encontrados no Brasil. O presente trabalho tem por finalidade fazer uma Revisão Sistemática de Literatura (RSL) para compreender: 1) Quais os principais mecanismos de resistência à polimixina B estão presentes em isolados provenientes de infecções na cidade do Recife-Pernambuco; 2) Verificar se há presença de algum tipo clonal (ST ou CC) predominante; 3) Identificar quais são os outros mecanismos genéticos associados à resistência nesses isolados bacterianos.

METODOLOGIA

Este é um estudo de revisão sistemática da literatura desenvolvido com base em produções científicas indexadas nas bases de dados eletrônicas: Google Acadêmico, Medline,

Periódicos CAPES, Portal Regional BVS, PubMed, Scielo e Scopus. Outras bases de dados institucionais foram consultadas, como os repositórios da Universidade Federal de Pernambuco e da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

A revisão sistemática, assim como outros tipos de estudo de revisão, é uma forma de pesquisa que utiliza como fonte de dados a literatura sobre determinado assunto. Esse tipo de investigação disponibiliza um resumo das evidências relacionadas a uma estratégia de intervenção específica, mediante a aplicação de métodos explícitos e sistematizados de busca, apreciação crítica e síntese da informação selecionada (Sampaio, 2006). A revisão sistemática responde a uma pergunta específica e utiliza métodos explícitos e sistemáticos para identificar, selecionar e avaliar criticamente os estudos, para coletar e analisar os dados desses estudos a serem incluídos na revisão (Castro, 2001). A pergunta norteadora desta RSL foi: Quais as características moleculares e epidemiológicas de isolados resistentes à polimixina B em Recife

Para as buscas na literatura o recorte temporal abrangeu o período de 2016 a 2023, a partir dos seguintes critérios de inclusão: 1) isolados de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B provenientes da cidade do Recife com ano de isolamento entre 2011 e 2019; 2) Descrição de mecanismos genéticos associados a resistência à polimixina B; 3) Ocorrência de outros genes de resistência atrelados aos isolados de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B.

Para as buscas nas bases as palavras-chaves usadas foram: “*Klebsiella pneumoniae*”; “polymyxin B resistance”; “molecular mechanism”; “Recife” or “Pernambuco”; “producing KPC”; “epidemic outbreak”; “Epidemiology “ ; “Clinical isolates”. A partir disso, foram selecionados 11 trabalhos, desses, 3 encontravam-se em duplicidade e foram descartados. Dos 8 materiais que restaram, 3 não atendiam aos critérios de inclusão e foram excluídos, restando

apenas 5 deles trabalhos para esta revisão, os quais são: 3 artigos, 1 tese e 1 monografia. Os estudos incluídos nesta RSL foram organizados da seguinte maneira: isolados agrupados por ano de isolamento, partindo dos mais antigos até os mais recentes e seus respectivos autores.

RESULTADOS

K. pneumoniae tem sido relatada como patógeno causador de infecções nosocomiais com impacto para saúde humana, estando associada a casos de resistência a múltiplas drogas. Esse fenótipo tem causado preocupações aos órgãos de saúde ao redor de todo o mundo, devido à ameaça da indisponibilidade de recursos terapêuticos para o combate dessas infecções. *K. pneumoniae*, por exemplo, possui a habilidade de adquirir e acumular uma diversidade de mecanismos de resistência a múltiplas drogas, incluindo a Polimixina B (Gales *et al.*, 2011; Poirel *et al.*, 2017). Vários surtos epidêmicos com isolados resistentes a carbapenêmicos e a polimixina têm sido relatados na Europa e na América.

No Brasil, a carbapenemase KPC é endêmica desde 2006, sendo o primeiro relato na cidade de Recife, Pernambuco (Dalmolin *et al.*, 2018). A vasta utilização dos carbapenêmicos culminou na retomada do uso das polimixinas na antibioticoterapia, porém a pressão do uso desses fármacos também acarretou na resistência às polimixinas no Brasil (Antoniadou *et al.*, 2007; Sampaio, 2016). Estudos posteriores documentaram aumento nas taxas de resistência, nos quais 15% dos isolados eram categorizados como resistentes à polimixina B em 2013, conforme evidenciado por Pereira e colaboradores, em um estudo com isolados provenientes de diversos estados brasileiros. Em 2015, a taxa de resistência à polimixina B chegou a 27,1% dos isolados analisados, segundo Bartoletti e colaboradores, em um estudo realizado com isolados da cidade de São Paulo (Perreira, 2013; Bartoletti, 2020).

Aires e colaboradores (2016) descreveram 2 isolados de *K. pneumoniae* de 2011, provenientes de Pernambuco que apresentaram resistência à polimixina B devido à

interrupção do gene *mgrB* pela IS 903B. Também foram encontradas mutações *nonsense* no gene *pmrB*, responsável pela regulação da transcrição de genes que atuam na modificação do LPS ou do Lipídio A frente à exposição polimixina. Esses isolados apresentaram-se como clones, pertencendo a ST11. Além da resistência à polimixina B, os isolados carregavam os genes: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}, (resistência aos carbapenêmicos); *qnrB* (resistência às quinolonas); *aadA*, *aac(3)IIa* e *aac(6)-Ib* (resistência aos aminoglicosídeos).

Silva e colaboradores (2018) reportaram 2 isolados de *K. pneumoniae* de 2013, que apresentavam o gene *mgrB* interrompidos pela presença da IS 5-like. Quanto aos genes dos sistemas de dois componentes, nenhuma alteração foi relatada. Ambos os isolados foram identificados como clones pertencentes a ST423. Além disso, eram resistentes aos carbapenêmicos, albergando os genes de resistência *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-11} e *bla*_{KPC-2}. Além disso, identificaram a presença de um integron de classe 1 que carregava os genes *dfp* A12 (resistência ao trimetoprim) e *aad* A2 (resistência à estreptomicina e à espectinomicina), essa associação de múltipla resistência a drogas dificultou na terapêutica do paciente imunocomprometido que veio a óbito em decorrência da infecção.

Em uma investigação mais minuciosa acerca da resistência à polimixina B em enterobactérias realizada em 2020 por Rocha e colaboradores, foram descritos 2 isolados de *K. pneumoniae* de 2016, 1 dos isolados apresentou o gene *mgrB* interrompido devido a uma IS903. Acerca dos sistemas de dois componentes PhoP/PhoQ e PmrA/PmrB, não foram relatadas alterações. Os isolados pertenciam a ST distintas, ST15 e ST54, ambos os isolados eram produtores de KPC-2 e apresentavam resistência aos carbapenêmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, fosfomicina, sulfonamida, trimetoprima, fenicol e tetraciclina. No isolado pertencente a ST15, foi identificada a presença de plasmídeo IncX4 carregando o gene *mcr-1*, chamando a atenção para possível transmissibilidade e facilidade de disseminação da resistência à colistina.

Recentemente, Andrade (2021) reuniu 16 isolados de *K. pneumoniae* coletados entre os anos de 2014 e 2016, com a finalidade de identificar os mecanismos responsáveis pela resistência à polimixina B. Todos os isolados apresentaram o gene *pmrB* mutado, além disso, em alguns isolados o gene *mgrB* estava interrompido por sequências de inserção, sendo relacionadas as IS 903B e ISKpn13. Quanto aos sistemas de dois componentes, no sistema Phop/PhoQ, alguns isolados apresentaram proteínas incompletas. Para o sistema PmrB/PmrA, o gene *pmrB* apresentou mutações do tipo *frameshift*, a qual resulta na mudança da matriz de leitura, ou missense, resultando na mudança de aminoácido. O gene *pmrA* apresentou mutações silenciosas, que não interferiram na função proteica. Ao analisar a filogenia desses isolados, foi possível observar a circulação de várias linhagens, sendo identificadas as ST11, ST25, ST340, ST423 e ST3990. Esses achados caracterizam uma disseminação policlonal no hospital. Concomitantemente, além da resistência à Polimixina B, genes que codificam β -lactamases foram encontrados em todos os isolados, *bla_{KPC}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, caracterizando um perfil de resistência a múltiplas drogas.

Em 2023, Souza, identificou 1 isolado de *K. pneumoniae* resistente à polimixina B, o qual apresentou diversas mutações nos genes *mgrB*, *pmrA* e *pmrB*, sendo as do tipo *frameshift* com maior significância devido a mudança na matriz de leitura. Esse isolado é pertencente a ST855 e já havia sido identificado por Aires e colaboradores em 2011. Além da resistência à polimixina B, o isolado também era resistente aos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas e sulfonamidas.

Fazendo uma síntese dos dados acerca dos mecanismos moleculares identificados nos isolados coletados entre os anos de 2011 a 2019, é possível comparar as ST e os mecanismos de resistência à polimixina B e a presença de genes de resistência associados a outras classes de antimicrobianos. A partir disso, foi construída a tabela 1, a qual reúne as principais informações coletadas por este trabalho.

Tabela 1. Características clínicas, moleculares e fenotípicas dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina B.

ID	Ano	Sitio de infecção	PMBCIM ($\mu\text{g/mL}$)	Perfil de MLST	Mecanismos relatados de Resistência à Polimixina					Outros genes de resistência	Referência
					<i>mgrB</i>	<i>phoP</i>	<i>phoQ</i>	<i>pmrA</i>	<i>PmrB</i>		
CCBH6984	2011	SWR	128	ST855	Δ pela IS 903B	CON	CON	CON	T246A, R256G	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>qnrB</i> , <i>aadA</i> , <i>aac(3')IIa</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	Aires, 2016
CCBH7050	2011	SWR	>128	ST855	Δ pela IS 903B	CON	CON	CON	T246, R256G	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>qnrB</i> , <i>aadA</i> , <i>iadB</i> , <i>aac(3')IIa</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	
KPR1	2013	LCR	>128	ST423	Δ pela IS 5-like	CON	A309C, A449G	CON	CON	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i>	Silva et al., 2018
KPR2	2013	LCR	>128	ST423	Δ pela IS 5-like	CON	A309C, A449G	CON	CON	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i>	
C119	2016	FLP	512	ST15	CON	CON	SIN	CON	CON	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{SHV-28} , <i>aadA2</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrB2</i> , <i>qnrS1</i> , <i>fosA</i> , <i>sul1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>dfrA25</i> ,	Rocha et al., 2020

										<i>catA2, tetA; tetD, mcr -1</i> (plasmideos <i>IncX4</i>)
										<i>bla_{CTX-M-2}, bla_{SHV-36}, bla_{KPC}, aadA1, aadA3, aph(3')-VIa, aac(6')-Iq, qnrB34, fosA, sul1, sul2, dfrA15, catA2, cmlA1</i>
C151	2016	CAT	32	ST54	Δ pela IS 903	CON	SIN	CON	CON	
Pol - 1	2014	SIN	≥ 64	ST11	INT	CON	L30Q	CON	T246A, R256G	<i>bla_{KPC-2}, bla_{TEM-1}, bla_{SHV-11}, bla_{CTXM-141-like}</i>
Pol - 2	2014	SAN	≥ 64	ST11	Δ pela ISKpn13	CON	A345stop	CON	A61stop	<i>bla_{KPC-2}, bla_{TEM-1}, bla_{SHV-11}, bla_{CTXM-141-like}</i>
Pol - 3	2014	URI	≥ 64	ST11	Δ pela ISKpn13	CON	H221stop	CON	A61stop	<i>bla_{KPC-2}, bla_{TEM-1}, bla_{SHV-11}, bla_{CTXM-141-like}</i>
Pol - 4	2014	URI	≥ 64	ST11	Δ pela ISKpn13	CON	CON	CON	A61stop	<i>bla_{KPC-2}, bla_{TEM-1}, bla_{SHV-11}, bla_{CTXM-141-like}</i>
Pol - 5	2014	SAN	≥ 64	ST340	INT	CON	H221stop	CON	T246A, R256G	<i>bla_{KPC-2}, bla_{TEM-1}, bla_{SHV-11}, bla_{CTXM-15-like}</i>

Pol - 6	2014	TCT	32	ST11	Δ pela S903B	CON	CON	CON	G216stop	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-11}
Pol - 7	2014	PCT	8	ST11	Δ pela IS903B	CON	A345stop	CON	T246A, R298stop	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-11}
Pol - 8	2014	URI	≥ 64	ST11	INT	CON	CON	CON	T246A, R256G, R298stop	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{CTXM-2-like}
Pol - 9	2014	URI	4	ST11	INT	CON	CON	CON	A61stop	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{CTXM-15-like}
Pol - 10	2014	URI	≥ 64	ST11	Δ pela SKpn13	G6stop	CON	CON	A61stop	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{CTXM-141-like}
Pol - 11	2014	URI	≥ 64	ST25	Δ pela IS903B	CON	CON	CON	T246A	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{CTXM-141-like}
Pol - 14	2014	SAN	32	ST25	Δ pela IS903B	CON	A345stop	CON	A61stop	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{CTXM-141-like}

Pol - 15	2014	URI	16	ST25	Δ pela IS903B	G6stop	CON	CON	A5P A61stop	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{CTXM-141-like}	
Pol - 16	2014	URI	≥64	ST3990	Δ pela ISKpn13	CON	CON	CON	A61stop	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{CTXM-141-like}	
Pol - 17	2014	URI	≥64	ST11	Δ pela ISKpn13	CON	CON	CON	A61stop	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{CTXM-141-like}	
Pol - 21	2016	URI	16	ST423	INT	CON	A345stop	CON	A61stop	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{CTXM-15-like}	
U1093	2019	URI	>4	ST855	T2CAGCG TCCGGGA	SIN	SIN	3C67TGG 3CC67AA TA*	TGG 67GC	<i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-2-like} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>qnrB19</i> , <i>aadA1</i> , <i>aph(6)-id</i> , <i>aph(4)-ia</i> , <i>aac(6')-iq</i> , <i>aac(3)-iv</i> , <i>aadA1</i> , <i>aph(3'')-ib</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	Souza, 2023

Legenda: AST - Aspiração traqueal; CAT - Cateter; CON- Conservada; FLC - Fluido cerebral; FLP - Fluido peritoneal; INT - Íntegra; LCR - Líquido cefalorraquidiano; MLST - Tipagem de sequência multilocus; PCT - Ponta de cateter; PMB - Polimixina B; SAN - Sangue; SIN - Sem informação; SWR - Swab retal; TCT - Transcateter; URI - Urina *Outras mutação também foram relatadas nesse estudo

DISCUSSÃO

A partir da análise baseada nos dados colhidos na literatura selecionada a resistência à polimixina B foi amplamente associada a mecanismos cromossômicos que envolvem os sistemas de dois componentes, como PmrA/PmrB, PhoP/PmrQ. Mutações associadas aos genes dos sistemas de dois componentes, *pmrA*, *pmrB*, *phoP* e *phoQ*, estão relacionadas à resistência à polimixina B, por desencadearem alteração na carga das membranas devido a adição de L-Ara4N no LPS ou PEtN no lipídio A, isso compromete interação eletrostática entre o antimicrobiano e as membranas, resultando na resistência. Adicionalmente, mutações no gene *mgrB*, levaram a inativação deste, o qual tem papel de regular negativamente PhoQ. Quando interrompido esse gene está relacionada a resistência a polimixina B, devido a modificação de cargas das membranas (Gun *et al.*, 2008; Cannatelli *et al.*, 2013; Paterson & Harris, 2016; McConville *et al.*, 2020).

A interrupção do gene *mgrB* foi relatada em 4 dos 5 trabalhos, tendo como fator de interrupção a presença de Sequências de Inserção (IS), para os casos descritos em Recife, a IS mais comum é a IS903, ou seja, evolutivamente, esse mecanismo continua sendo repassado entre as gerações desde 2011, ano em que houve o primeiro relato por Aires e colaboradores (2016). Outra associação de resistência relacionada aos sistemas de dois componentes é a presença de mutações nos genes de manutenção desses sistemas (*phoP*, *phoQ*, *pmrA* e *pmrB*), onde nos isolados para os quais houve investigação dos mecanismos de resistência envolvendo esses sistemas, mesmo diante da integridade do regulador *mgrB*, o gene *pmrB* apresentou mutação em todos os isolados.

No trabalho de Rocha e colaboradores (2020), foi identificado no isolado da ST54 o gene plasmidial *mcr-I*, sendo associado à resistência à colistina. Mesmo não sendo um mecanismo prevalente, sua ocorrência revela uma potencial via de disseminação de resistência à colistina (polimixina E). A descoberta do *mcr-I* anuncia a violação do grupo de

antibióticos de última escolha, as polimixinas, por resistência mediada por plasmídeos. Essa via de disseminação em associação com a resistência aos carbapenêmicos entre as enterobactérias acarreta uma grande preocupação clínica, pois agravou o processo de seleção de microrganismos resistentes (Du *et al.*, 2016; Felgenhauer *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016).

Quanto a filogenia dos isolados, 3 isolados pertenciam à linhagem ST855, destes, 2 são clones circulantes em 2011 (Aires *et al.*, 2016), e outro, circulante em 2019 (Souza, 2023), porém, além da resistência aos carbapenêmicos e aminoglicosídeos, este último isolados (Souza, 2019) conta com genes de resistência às quinolonas e sulfonamidas. Isso sugere que essa linhagem deve ter adquirido mecanismos de resistência a outros fármacos ao longo do tempo, como resultado da pressão imposta pela exposição aos antimicrobianos.

Em 2013, temos 2 isolados ST423, com perfil de resistência aos carbapenêmicos, trimetoprim e aminoglicosídeos. Já em 2014 (Andrade, 2021) é possível observar a circulação das ST11, ST25, ST340 e ST3990, revelando um aumento da diversidade de cepas resistentes circulantes. O que foi observado em isolados de 2016 (Rocha *et al.*, 2020; Andrade, 2021), com a circulação de cepas de várias origens filogenéticas, como ST423, ST15 e ST54, revelando a variedade das cepas circulantes, dos mecanismos e dos genes envolvidos nos perfis de resistência.

O fenótipo de resistência em *K. pneumoniae* apresenta uma ampla variedade de mecanismos, devido sua capacidade de adquiri-los. Esses mecanismos atrelados à resistência indicam que os eventos de adaptabilidade evolutiva, mesmo que distintos, convergem para o estabelecimento do mesmo mesmo fenótipo de resistência à polimixina B. Além disso, análise sobre as ST circulantes revela que existem manutenção delas ao longo dos anos, algumas relacionadas com surtos epidêmicos no Brasil em outras regiões do mundo, como é o caso da ST11 (Pereira *et al.*, 2013; Aires *et al.*, 2016; Braun *et al.*, 2018).

Além disso, a resistência a múltiplas drogas também foi detectada, devido à presença de genes envolvidos na resistência aos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, sulfonamidas, quinolonas e outros, os foram identificados em todos os isolados reunidos neste estudo,. Dentre os β -lactâmicos os genes mais frequentes foram: *bla_{KPC}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*. O que pode ser resultado da vasta utilização de cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos no ambiente hospitalar e que impulsionou a reintrodução da polimixina B, como droga de última escolha (Gurjar, 2015).

Com isso, podemos inferir uma correlação da resistência à polimixina B a essa vasta utilização dos carbapenêmicos, pois são drogas de amplo espectro dentro do grupo dos β -lactâmicos, tendo em vista que na ineficiência dos carbapenêmicos, pelo emergência de diversos genes plasmidiais nos últimos anos, e pela utilização em larga escala da polimixina de maneira indiscriminada na clínica, o que pode ter induzido a resistência a este fármaco. Contribuindo para o perfil de resistência a múltiplas drogas em *K. pneumoniae*, outros genes estão associados à resistência à trimetoprima, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, fosfomicina, sulfonamida, fenicol, tetraciclina e tigeciclina.

Com base nos achados reunidos por esta revisão sistemática, podemos inferir a disseminação policlonal de isolados de *K. pneumoniae* resistente à polimixina B em Recife ao longo do intervalo de tempo estudado. Esse fenótipo de resistência a polimixina B tem como principal mecanismo a interrupção do gene *mgrB*, mecanismo também descrito por (Cannatelli *et al.*, 2013; Aires *et al.*, 2016; Paterson & Harris, 2016) também encontrado nos trabalhos aqui reunidos (Aires *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018; Rocha *et al.*, 2020; Andrade, 2021).

Além disso, a maioria dos isolados resistentes à polimixina B analisados por este trabalho apresentam mutações no gene *pmrB*. O gene *pmrB* codifica uma proteína sensora histidina-quinase (PmrB), a qual é responsável por fosforilar a proteína reguladora de resposta

(PmrA). O sistema PmrA/PmrB está relacionado à ativação de genes que desencadeiam a modificação de cargas das membranas por distintas vias, seja adicionando L-Ara4N ao LPS ou PEtN ao lipídio A, culminando na resistência à polimixina (Olaitan *et al.*, 2014; Paterson & Harris, 2016; McConville *et al.*, 2020). É a partir de PmrB que o mecanismo que resulta na resistência tem origem, sendo assim, mutações envolvendo esse gene devem ser melhor estudadas para compreensão de seus impactos na resistência à polimixina B.

CONCLUSÃO

A partir do levantamento realizado por este estudo foi possível observar lacunas temporais existentes nos anos de 2012, 2015, 2017, 2018, referente aos estudos de isolados resistentes à polimixina B, sendo assim, é imprescindível que novos estudos de epidemiologia molecular sejam realizados para que tenhamos melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na disseminação da resistência à polimixina B nos hospitais da cidade do Recife.

No entanto, diante dos dados aqui estudados podemos concluir, que:

- O principal mecanismo associado à resistência à polimixina B em Recife é a interrupção do gene *mgrB* devido a adição de sequências de inserção;
- Considerando os genes dos sistemas de dois componentes acredita-se que mutações no gene *pmrB* tenham maior impacto na resistência à polimixina;
- Quanto à circulação de cepas ao longo dos anos analisados fica evidente disseminação policlonal de cepas resistentes à polimixina B, porém há prevalência da ST855 e da ST423, as quais aparecem em mais de um recorte temporal analisado;
- Todos os isolados apresentaram resistência aos carbapenêmicos, com a presença do gene *bla_{KPC}*.

- Além da resistência aos carbapenêmicos, os isolados resistentes à polimixina apresentaram resistência associada à trimetoprima, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, fosfomicina, sulfonamida, fenicol, tetraciclina e tigeciclina.

Para que seja possível uma tomada de decisão assertiva com finalidade de mitigar a problemática da resistência antimicrobiana na cidade do Recife, Pernambuco, é necessário que mais estudos acerca da epidemiologia molecular sobre os mecanismos de resistência à polimixina B e outros antimicrobianos sejam realizados. Os altos índices de resistência à polimixina e outros antimicrobianos são preocupantes, pois tem impacto direto na clínica médica, refletindo no aumento da morbidade e mortalidade. Diante da problemática aqui apresentada e seus impactos para saúde pública, evidencia-se a necessidade de criação de programas de vigilância epidemiológica com o objetivo de monitorar, controlar e minimizar a problemática da resistência aos antimicrobianos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

CONFLITOS DE INTERESSE

Declaro que não há conflito de interesse.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

REFERÊNCIAS

Ah YM, Kim AJ and Lee JY (2014) Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents*. 44:8-15.

Aires CAM, Pereira PS, Asensi MD and Carvalho-Assef APD. 2016. MgrB mutations mediating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal surveillance swabs in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 60:6969-6972.

Akshay S et al. (2021) **Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane** *eLife* **10**:e65836.

Andrade, RL. ANÁLISE DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A POLIMIXINA EM ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* [monografia]. Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2021.

Bartolleti F, Seco BMS, dos SANTOS CC, Felipe CB, Lemo MEB, Alves TSA, et al. 2016. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis* 22:1849-1851.

Bowers JR, Kitchel B, Driebe EM, MacCannell DR, Roe C, Lemmer D, et al. (2015) Genomic Analysis of the Emergence and Rapid Global Dissemination of the Clonal Group 258 *Klebsiella pneumoniae* Pandemic. *PLoS ONE* 10(7): e0133727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133727>

Braun G, Cayo R, Matos AP, Fonseca JM, Gales AC. Temporal evolution of polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones recovered from blood cultures in a teaching hospital during a 7-year period. *Int J Antimicrob Agents*. 2018; 51(3): 522-27.

Brehony, C.; Jolley, K. A.; Maiden, M. C. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 31, n. 1, p. 15-26, 2007.

Castro AA. Revisão sistemática com e sem metanálise 2001 Disponível em URL: <http://www.evidencias.com>. Consultado em: 28/08/2023.

Cheng YH, Lin TL, Lin YT, Wang JT. 2016. Amino acid substitutions of CrrB responsible for resistance to colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:3709–3716.

Dalmolin TV, Martins AF, Zavascki AP, Lima-Morales D and Barth AL. 2018. Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 90:132-133.

Dong N, Zhang R, Liu L, Li R, Lin D, Chan EW, Chen S. Genome analysis of clinical multilocus sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* from China. *Microb Genom*. 2018 Feb;4(2):e000149. doi: 10.1099/mgen.0.000149

Du H, Chen L, Tang YW, Kreiswirth BN. 2016. Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Lancet Infect Dis* 16:287–288. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00056-6.

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Koutsoumanis K, Allende A, Álvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, De Cesare A, Herman L, Hilbert F, Lindqvist R, Nauta M, Ru G, Simmons M, Skandamis P, Suffredini E, Argüello H, Berendonk T, Cavaco LM, Gaze W, Schmitt H, Topp E, Guerra B, Liébana E, Stella P and Peixe L, 2021. Scientific Opinion on the role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. *EFSA Journal* 2021;19(6):6651, 188 pp. 10.2903/j.efsa.2021.6651

Felgenhauer L, Waezsada SE, Yao Y, Imirzalioglu C, Kasbohrer A, Roesler U, Michael GB, Schwarz S, Werner G, Kreienbrock L, Chakraborty T, RESET consortium. 2016. Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *Lancet Infect Dis* 16:282–283. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00009-8.

Gales AC, Jones RN, Sader HS. 2011. Atividade contemporânea de colistina e polimixina B contra uma coleção mundial de patógenos Gram-negativos: resultados do Programa de Vigilância Antimicrobiana sentry (2006-09). *J Antimicrob Chemother* 66:2070-2074.

Gunn, JS. (2008). The salmonella PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol.* 16, 284–290. doi: 10.1016/j.tim.2008.03.007

Gurjar M. 2015. Colistin for lung infection: an update. *J Intensive Care.* 3:3.

Hawley, JS.; Murray, CK.; Jorgensen, J.H. **Colistin heteroresistance in Acinetobacter and its association with previous colistin therapy.** *Antimicrob Agents Chemother*, v 52, p.351-352. 2008

Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. 2017. Resistance to polymyxins in Gram negative organisms. *Int J Antimicrob Agents.*

Kato, A.; Latifi, T., Groisman, EA. **Closing the loop: the PmrA/PmrB two-component system negatively controls expression of its posttranscriptional activator PmrD.** *Proc Natl Acad Sci.*, v.100, p. 4706-4711. 2003.

Kox, L.F.; Wosten, MM.; Groisman, EA. **A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system.** *Embo J.*, v.19, p.1861-1872. 2000.

Leavitt, A., S. Navon-Venezia, I. Chmelnitsky, MJ Schwaber e Y. Carmeli. 2007. *Emergência de KPC-2 e KPC-3 em cepas de Klebsiella pneumoniae resistentes a carbapenem em um hospital israelense.* *Antimicrobiano. Agentes Quimother.* **51** : 3026-3029.

Liu Y. Y., Wang Y., Walsh T. R., Yi L. X., Zhang R., Spencer J, et al.. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 161–168. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7

Maiden, M. C. et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1998.

Martin RM & Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018 Jan 22;8:4. doi: 10.3389/fcimb.2018.00004.

Meletis G., Oustas E., Botziori C., Kakasi E., Kotli A. 2015. Containment of carbapenem resistance rates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in a Greek hospital with a concomitant increase in colistin, gentamicin and tigecycline resistance. *New Microbiol* 38:417-421.

Naas, T., P. Nordmann, G. Vedel e C. Poyart. 2005. β -lactamase KPC hidrolisadora de carbapenem mediada por plasmídeo em um isolado de *Klebsiella pneumoniae* da França. *Antimicrobiano. Agentes Quimoter.* **49** : 4423-4424.

Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. 2014. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers Microbiol*. 5:643

Ortwine, J.K; Kaye, K.S; LI, J; Pogue, J.M. 2015. Colistin: Understanding and applying recent Pharmacokinetic advances. *Pharmacotherapy*. 35:11-6

Paterson D. L. & Harris P. N. (2016). Colistin resistance: a major breach in our last line of defence. *Lancet Infect. Dis.* 16, 132–133. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00463-6

Pereira, P.S; Araújo, C.F; Seki, L.M; Zahner, V; Carvalho; A.P.A; Asensi, M.D. (2013). Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother.* 68:312-16.

Perez-Losada, M. et al. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect. Genet. Evol.*, v. 16, n., p. 38-53, 2013.

Picão, R.C et al. 2013. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and *Enterobacteriaceae* in sewage. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 76:80–85.

Poirel L, Jayol A, Nordmann P. 2017. Polymyxins Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 30:557-596.

Raetz, C.R.; Reynolds, C.M.; Trent, M.S.; Bishop, R.E. **Lipid A modification systems in gram-negative bacteria.** *Annu Rev Biochem.* Vol.76, p.295-329. 2007.

Rao, S.D.; Igoshin, O.A. **Overlaid positive and negative feedback loops shape dynamical properties of PhoPQ two-component system.** *PLoS Comput Biol.*, v.17, n.1. 2021.

Rodrigues, A.C.S. et al. Non-clonal occurrence of pmrB mutations associated with polymyxin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.114, 2019.

Sampaio, J.L.M. GALES, A.C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxin. *Brazilian journal of microbiology*, v.47, p.31-37, 2016.

Schmidl, S.R.; Sheth, R.U.; Wu, A.; Tabor, J.J. **Refactoring and optimization of light-switchable Escherichia coli two-component systems.** *ACS Synth Biol.*, v.3, n.11, p.820-31. 2014.

Silva HRF, Vilela MA, Almeida ACS, Morais MMC. 2018. Colistin-resistant KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* ST423 harboring an IS5-like element in the mgrB gene isolated from cerebrospinal fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 91:184-185.

Souza, PMS. Estudo epidemiológico e molecular de isolados clínicos bacterianos do estado de Pernambuco resistentes a antibióticos. 2023. Tese (Doutorado) - Doutorado em Biologia Celular e Molecular Aplicada, Universidade de Pernambuco, Pernambuco, 2023.

Stock, A.M.Robinson, V.L.; Goudreau, P.N. **Two-component signal transduction.** *Annual review of biochemistry*, v.69, n.1, p.183–215. 2000.

Urwin, R.; Maiden, M. C. J. Multi-locus sequence typing: A tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.*, v. 11, n. 10, p. 479-487, 2003.

Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol.* 2013 Jun;8(6):711-24.

West A.H.; Stock, A.M. **Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems.** *Trends in Biochemical Sciences*, v.26, n.6, p.369-376. 2001.

WHO. World Health Organization. 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva, Switzerland: 257 p. Disponível em: www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb_ET_NM_WHO.pdf

Winfield MD, Groisman EA. Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Dec 7;101(49):17162-7. doi: 10.1073/pnas.0406038101

Yan A, Guan Z & Raetz CR (2007) An undecaprenyl phosphateaminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. *J Bio Chem.* 282:36077–36089.

Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* multirresistentes: Mecanismos de resistência e implicações terapêuticas. *Especialista Rev. Anti Infect. Lá.* 2010; 8 :71–93. doi: 10.1586/eri.09.108.

ANEXO A



ISSN: 0074-0276

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

O conteúdo das Memórias é de livre acesso aos leitores e não há cobrança de taxa de publicação dos autores. As Memórias do Instituto Oswaldo Cruz decidiram simplificar as exigências quanto ao formato dos manuscritos submetidos. A partir de agora, todos os manuscritos poderão ser submetidos em qualquer formato de texto desde que seguida a subdivisão comum dos artigos científicos, como introdução, materiais e métodos, resultados, discussão e referências. Para artigos de Revisões e Perspectivas, os autores poderão utilizar as seções que melhor se adequam à estrutura e ao conteúdo do manuscrito proposto. Todos os manuscritos deverão conter, além do título e do resumo, detalhes completos dos autores e instituições, agradecimentos por qualquer assistência técnica ou financeira, bem como indicar quaisquer conflitos de interesse. Este formato de texto flexível será utilizado para a análise inicial e revisão por pares. Se o manuscrito for aceito,

Após a aceitação, o manuscrito deverá ser organizado no seguinte formato:

O manuscrito deverá ser elaborado em software padrão de processamento de texto e deverá ser impresso (fonte 12) em espaço duplo em todo o texto, legendas de figuras e referências, com margens de no mínimo 3 cm. As figuras deverão vir na extensão tiff, com resolução mínima de 300 dpi. As tabelas e legendas das figuras deverão ser apresentadas todas juntas

em um único arquivo. As figuras devem ser carregadas separadamente como arquivo suplementar.

Título : com até 250 caracteres

Nomes dos autores : sem títulos ou graduações

Afiliações institucionais : endereço completo de todos os autores

Resumos: Forneça um resumo de até 200 palavras. Os resumos dos artigos de pesquisa devem ser estruturados em 5 seções como segue: FUNDAMENTOS, OBJETIVOS, MÉTODOS, RESULTADOS e PRINCIPAIS CONCLUSÕES, cada seção abordando respectivamente o problema, o objetivo do estudo, a principal abordagem metodológica, os achados mais importantes e as conclusões do estudo. o estudo.

Palavras-chave : 3-6 itens devem ser fornecidos. Devem ser usados termos da lista Medical Subject Headings (Mesh) do Index Medicus.

Patrocínios : indicar as fontes de apoio financeiro.

Introdução : deve definir o objetivo do estudo, fornecer um breve resumo (não uma revisão) de trabalhos anteriores relevantes e indicar quais novos avanços foram feitos na investigação. Não deve incluir dados ou conclusões do trabalho que está sendo relatado.

Materiais e Métodos : devem fornecer informações completas e claras para permitir que o estudo seja repetido por outros. As técnicas padrão precisam apenas ser referenciadas. Entretanto, se uma modificação tiver sido feita em um protocolo padrão, ela deverá ser claramente descrita.

Ética : ao relatar experimentos em seres humanos, indicar se os procedimentos seguidos estavam de acordo com os padrões éticos do comitê responsável pela experimentação humana (institucional ou regional) e com a Declaração de Helsinque de 1975, revisada em 1983. Ao relatar experimentos em animais, indique se o guia da instituição ou de um conselho nacional de pesquisa, ou qualquer lei nacional sobre o cuidado e uso de animais de laboratório, foi seguido. Caso o trabalho de investigação utilize recursos naturais (plantas, microrganismos, amostras de biodiversidade) os autores devem fornecer uma declaração de que o trabalho de investigação está em conformidade com os regulamentos nacionais sobre este assunto.

Resultados : devem ser um relato conciso das novas informações descobertas, com o mínimo de julgamento pessoal. Não repetir no texto dados já descritos em tabelas e ilustrações.

Discussão : deve enfatizar a relevância das novas informações e relacionar as novas descobertas com o conhecimento existente. Somente citações inevitáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos : devem listar e dar crédito total a todos aqueles (exceto os autores) que ajudaram na realização do trabalho de pesquisa (incluindo as organizações financiadoras).

Conflito de interesses: os autores devem divulgar qualquer conflito de interesses relacionado ao seu trabalho de pesquisa.

Contribuição do autor : indicar a contribuição de cada autor para o trabalho de pesquisa.

REFERÊNCIAS

Deve ser preciso. Somente citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Artigos em Preprint Servers só podem ser citados se for fornecido um DOI. Artigos não publicados, a menos que sejam aceitos para publicação, não devem ser citados. O trabalho aceito para publicação deve ser referido como “no prelo” e o link do periódico para o manuscrito aceito ou uma carta de aceitação do periódico deve ser fornecido. Dados não publicados somente deverão ser citados no texto como “observações não publicadas”, devendo ser fornecida uma carta de autorização do autor. As referências ao final do artigo deverão ser listadas em ordem numérica e na mesma ordem em que são citadas no texto.

Deve ser preciso. Somente citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Artigos em Preprint Servers só podem ser citados se for fornecido um DOI. Artigos não publicados, a menos que sejam aceitos para publicação, não devem ser citados. O trabalho aceito para publicação deve ser referido como “no prelo” e o link do periódico para o manuscrito aceito ou uma carta de aceitação do periódico deve ser fornecido. Dados não publicados somente deverão ser citados no texto como “observações não publicadas”, devendo ser fornecida uma carta de autorização do autor. As referências ao final do artigo deverão ser listadas em ordem numérica e na mesma ordem em que são citadas no texto.

Para garantir que suas referências sejam publicadas conforme solicitado, envie arquivos sem Mendeley Hyperlink ou similar. Referências criadas com marcas de edição causarão correções inadequadas durante o processo de edição, causando atrasos.

O TÍTULO DAS REVISTAS

Deve ser abreviado de acordo com o NLM Title Abbreviation for Journals atualmente indexado no MEDLINE. Para obter detalhes, visite <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog?term=currentlyindexed>

CITAÇÕES NO TEXTO

Um número é atribuído a uma fonte na ordem em que ela é citada no texto. Se a fonte for referida novamente, o mesmo número será usado.

Use algarismos arábicos sobrescritos (1,2,3,4,5,6,7,8,9) dentro de colchetes curvos.

Liste cada número de referência separado por vírgula ou por travessão para uma sequência de números consecutivos. Não deve haver espaços entre vírgulas ou travessões. Ex.: (1,3,6-8)

A citação no texto é colocada imediatamente após o texto, que se refere à fonte citada.

Ex.: Estas observações foram consistentes com aquelas feitas na Venezuela, no Brasil e na Guiana Britânica. (1-4)

O nome do autor também pode ser incluído no texto.

Ex.: O método de quantificação da viabilidade dos ovos foi adaptado de Farnesi et al. (1)

NO FINAL DO PAPEL USE OS SEGUINTE ESTILOS

Artigo de revista

Chagas C, Villela E. Forma cardíaca da tripanossomiase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1922; 14(1): 05-61.

Livro e Tese

Forattini OP. Entomologia médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose. Vol. 4. São Paulo: Edgard Blucher; 1973. 658 pp

Genes e antígenos de parasitas. Um manual de laboratório. 2ª edição. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1983. xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC. Controle alternativo e alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 pela ação do

látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* NEB (Euphorbiaceae) [Tese de doutorado]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2005. 85 pp.

Capítulo do livro

Cruz OG. A profilaxia da malária no centro e sul do Brasil. *In* : Ross R, A prevenção da malária. Londres: John Murray; 1911. 390-8.

Artigo de revista na Internet

Abood S. Iniciativa de melhoria da qualidade em lares de idosos: a ANA desempenha um papel consultivo. *Sou J Nurs* [Internet]. 2002 [citado em 12 de agosto de 2002]; 102(6). Disponível em: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>.

Monografia na Internet

Foley KM, Gelband H, editores. Melhorando os cuidados paliativos para o câncer [monografia] [Internet]. Washington: Imprensa da Academia Nacional; 2001 [citado em 9 de julho de 2002]. Disponível em: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Página inicial/site

Cancer-Pain.org [página inicial na Internet]. Nova York: Associação de Recursos Online do Câncer, Inc.; c2000-01 [atualizado em 16 de maio de 2002; citado em 9 de julho de 2002]. Disponível em: <http://www.cancer-pain.org/>.

Parte de uma página inicial/site

da American Medical Association [página inicial na Internet]. Chicago: A Associação; c1995-2002 [atualizado em 23 de agosto de 2001; citado em 12 de agosto de 2002]. Escritório de ligação de prática de grupo da AMA; [cerca de 2 telas]. Disponível em: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>.

BANCO DE DADOS NA INTERNET

Banco de dados aberto

Who's Certified [banco de dados na Internet]. Evanston (IL): O Conselho Americano de Especialistas Médicos. c2000 - [citado em 8 de março de 2001]. Disponível em: <http://www.abms.org/newsearch.asp>

Banco de dados fechado

Jablonski S. On-line Síndromes de Anomalia Congênita Múltipla/Retardo Mental (MCA/MR) [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EUA). c1999 [atualizado em 20

de novembro de 2001; citado em 12 de agosto de 2002]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html.

Parte de um banco de dados no Internet

MeSH Browser [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EUA); 2002. Meta-análise; 2003 [citado em 10 de junho de 2003]; [cerca de 15h]. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>.

AS FIGURAS E TABELAS DEVEM SER COMPREENSÍVEIS SEM REFERÊNCIA AO TEXTO

Figuras: apresentado em formato tiff com mínimo de 300 dpi. As fotografias devem ser bem focadas, bem contrastadas e, se montadas em placa, as figuras devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos. A ampliação deve ser indicada por uma linha ou barra na figura e referenciada, se necessário, na legenda (por exemplo, barra = 1 mm). As placas e figuras de linha devem caber em uma coluna (8 cm) ou em toda a largura (16,5 cm) da página e devem ser menores que o comprimento da página para permitir a inclusão da legenda. As letras e os números nas figuras devem ter tamanho legível após redução ou impressão. Uma fotografia colorida ou ilustração relacionada é utilizada nas redes sociais da Revista (Twitter, Instagram e Facebook) para breve informação sobre o conteúdo dos artigos aceitos.

Tabelas : devem complementar, e não duplicar, o texto e devem ser numeradas com algarismos romanos. Um breve título descritivo deve aparecer acima de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas de rodapé (identificadas com a, b, c, etc.) abaixo.

Material suplementar : refere-se aos arquivos que os autores fornecem para publicação junto com seu artigo. Geralmente devem ser peças adicionais ao artigo que não puderam ser incluídas no fascículo, como apêndices, planilhas, tabelas, figuras impossíveis de produzir dentro do artigo. Esses arquivos serão enviados aos revisores para revisão por pares, juntamente com os arquivos principais do artigo.

Recomendamos que os arquivos Suplementares estejam no seguinte formato:

- Excel ou qualquer planilha devem ser carregados em formato PDF ou fornecer link para acesso aos arquivos
- Figuras suplementares com cinco ou mais peças favor fornecer um arquivo PDF com o máximo de figuras possível.

Recomendamos fornecer arquivos de tamanho pequeno para download rápido.

Revisão/Perspectiva: artigos no formato “revisão/perspectiva” são aceitos somente mediante convites feitos pelo editor ou editores associados.

Formato alternativo: os manuscritos podem ser submetidos seguindo os “Requisitos Uniformes para Manuscritos Submetidos a Revistas Biomédicas” produzidos pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas, também conhecido como Estilo Vancouver. Neste caso, os autores deverão seguir as orientações da quinta edição (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, ou no site <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreq/htm>) e será responsável por modificar o manuscrito onde for diferente das instruções aqui fornecidas, caso o manuscrito seja aceito para publicação.

Os autores também devem seguir os Requisitos Uniformes para quaisquer diretrizes omitidas nestas Instruções.

UMA VEZ QUE UM ARTIGO SEJA ACEITO PARA PUBLICAÇÃO, NENHUMA ALTERAÇÃO NO MANUSCRITO ORIGINAL SERÁ PERMITIDA, EXCETO PEQUENAS CORREÇÕES.

