

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Caracterização Molecular de Isolados de *Klebsiella pneumoniae* Resistentes às
Polimixinas

LISIANE RECH PANCOTTO

PORTO ALEGRE, 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Caracterização Molecular de Isolados de *Klebsiella pneumoniae* Resistentes às
Polimixinas

Dissertação apresentada por **Lisiane
Rech Pancotto** para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Coorientadora: Prof. Dra. Juliana Caierão

PORTO ALEGRE, 2020

Dissertação foi apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no dia 06 de abril de 2020, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Andreza Francisco Martins
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Cícero Armídio Gomes Dias
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Dr. Leandro Reus Rodrigues Perez
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

CIP - Catalogação na Publicação

Pancotto, Lisiane Rech
Caracterização Molecular de Isolados de *Klebsiella pneumoniae* Resistentes às Polimixinas / Lisiane Rech
Pancotto. -- 2020.
69 f.
Orientador: Afonso Luís Barth.

Coorientadora: Juliana Caierão.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Resistência Bacteriana. 2. Polimixina. 3. mgrB.
I. Barth, Afonso Luís, orient. II. Caierão, Juliana, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com o apoio financeiro do Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do HCPA (FIPE-HCPA) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Afonso, por ter me orientado desde a iniciação científica e ter aberto as portas para o mundo da microbiologia para mim. Obrigada pela paciência, por todas as oportunidades e todo o ensinamento.

À minha co-orientadora Juliana, por ter me ajudado desde o início com a escolha do tema do meu trabalho, no decorrer com as discussões sobre os resultados e ao fim, na escrita da dissertação.

Aos meus colegas do LABRESIS, por todos os momentos e cafés compartilhados. Agradeço à Daiana e à Priscila pela ajuda com os sequenciamentos, e especialmente à Daiana, que foi extremamente importante no auxílio da análise dos dados obtidos.

Aos meus colegas do Laboratório de Análises Clínicas Carlos Franco Voegeli da Santa Casa de Porto Alegre. À Maiara, que mesmo estando longe nos últimos meses para cuidar do Miguel nunca deixou de estar perto, à Camila, por ter me trazido tranquilidade nesses últimos meses, e também ao Everton, pelo ensinamento diário.

À todas as amigas que a vida me deu, Aline, Jéssica, Melina, Raíssa, Raylane, Rianne, Sheila, e em especial à Sabrina que passou por esse momento junto comigo. Juntas somos muito mais fortes, espero continuar compartilhando a vida com vocês! Ao Rafael, muito obrigada por todo o apoio e companheirismo nesses anos.

Por fim, à minha família que sempre me mostrou a importância dos estudos e me apoiou nas minhas decisões. Minha mãe, meu pai, minha mana, Tuco, minha vó e minha dinda, eu amo vocês, vocês são os meus maiores exemplos!

RESUMO

Este estudo teve como objetivo realizar a caracterização molecular de isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes às polimixinas, com foco em alterações cromossômicas. Um total de 35 isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e a polimixina B de 3 hospitais em Porto Alegre no período de abril de 2013 a agosto de 2015 foram incluídos no estudo. Todos os 35 isolados de *K. pneumoniae* apresentaram os genes *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP* e *phoQ* com o tamanho molecular esperado, indicando que nenhuma deleção ou inserção parcial ocorreu nesses genes. Nenhum dos isolados apresentou reação de PCR positiva para o gene *mcr-1*. A PCR para o gene *mgrB* foi positiva em 34 dos 35 isolados avaliados sendo que 23 isolados apresentaram o gene com o tamanho de aproximadamente 144 pares de base indicando que o mesmo estava intacto. Por outro lado, 11 isolados de *K. pneumoniae* (32,4%) apresentaram amplicons de *mgrB* com tamanho aumentado (em torno de 1500 bp), o que é compatível com a presença de IS. Um isolado apresentou resultado negativo na PCR para o gene *mgrB*, sugerindo deleção total do gene.

Os 12 isolados resistentes aos carbapenêmicos e polimixina B com alteração no gene cromossômico *mgrB* tiveram seu genoma completo sequenciado. Os dados do sequenciamento foram processados e analisados com a utilização de ferramentas de bioinformática apropriadas (<https://patricbrc.org>; <http://www.genomicepidemiology.org>; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), sendo comparados com sequências de referências depositadas. Genes relatados como responsáveis pela resistência à polimixina, como *mgrB*, *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP* e *phoQ* foram também analisados com os dados gerados pelo sequenciamento de todo genoma.

Os 11 isolados clínicos com *mgrB* alterado (amplicon com tamanho molecular aumentado) tiveram seus dados de NGS analisados na plataforma National Center for Biotechnology Information (NCBI) por similaridade a sequências referências. Desta forma, foi possível identificar 5 famílias diferentes de IS: 5 isolados interrompidos por sequências da família IS5 (45,5%), 3 isolados da família ISKpn13 (27,3%) e 1 isolado das respectivas famílias: IS1, IS3 e ISKpn26. Um único isolado não mostrou amplificação do gene *mgrB*, sendo

posteriormente confirmado a deleção por sequenciamento do genoma completo. Conforme nosso conhecimento, esses são os primeiros relatos de inserção de IS3, além de deleção total mutando o gene *mgrB*, em isolados provenientes do Brasil.

Embora os resultados da técnica de PCR com primers para os outros genes relacionados a resistência cromossomal à polimixina (*pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP* e *phoQ*) tenha indicado que todos estavam presentes e que não apresentavam alteração no tamanho molecular, foi possível identificar mutações missense e silenciosas através da análise dos dados de sequenciamento do genoma completo. As mutações encontradas incluíram: *pmrA* – missense mutation no isolado 4110 (L64R, D167E); *pmrB* – mutação missense no isolado 966 (S164P) e isolado 3854 (V300F), mutações missense e silenciosa no isolado 4110 (A84G, G111V, P145P, L233L); *pmrD* – mutação silenciosa (L25L); e *phoQ* – mutação silenciosa no isolado 4110 (I148I, S301S, D416D).

Além de genes relacionados a resistência à polimixina, outros genes foram identificados a partir da análise *in silico* dos dados do sequenciamento de todo genoma: *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* (resultado esperado visto que os isolados eram resistentes aos carbapenêmicos), enzimas modificadoras de aminoglicosídeos incluindo acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases; genes *tet* que conferem resistência a tetraciclinas bem como *bla_{CTX-M}* que confere resistência a beta-lactâmicos. Os dados de sequenciamento confirmaram que nenhum isolado apresentava o gene *mcr-1*.

Para determinar a sequence type (ST) dos isolados, os sete genes housekeeping (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* e *ton*) foram avaliados *in silico*. Foram identificadas 4 diferentes STs, 6 isolados pertenciam a ST437 (50,0%), 4 isolados a ST11 (33,3%), 1 isolado a ST16 e 1 a ST340 (8,3%).

Nossos resultados corroboraram com relatos anteriores sobre a resistência, mas também indicaram a complexidade que pode estar envolvida, muitas vezes tendo mais de um mecanismo envolvido na resistência. Cabe mencionar que um isolado com o gene *mgrB* com deleção total e um isolado com sequência de inserção IS3 alterando o gene, ambas as alterações não descritas anteriormente no Brasil.

Palavras Chaves: Resistência bacteriana; Polimixina; *mgrB*.

ABSTRACT

This study aimed to carry out the molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* isolates resistant to polymyxins, focusing on chromosomal alterations. A total of 35 clinical isolates of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems and polymyxin B from 3 hospitals in Porto Alegre from April 2013 to August 2015 were included in the study. All 35 isolates of *K. pneumoniae* had the *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP* and *phoQ* genes with the expected molecular size, indicating that no deletion or partial insertion occurred in these genes. None of the isolates showed a positive PCR reaction for the *mcr-1* gene. The PCR for the *mgrB* gene was positive in 34 of the 35 isolates evaluated, with 23 isolates presenting the gene with the size of approximately 144 base pairs indicating that it was intact. On the other hand, 11 (32.4%) isolates of *K. pneumoniae* presented increased *mgrB* amplicons (around 1500 bp), which is compatible with the presence of IS. One isolate had a negative PCR result for the *mgrB* gene, suggesting complete deletion of the gene.

The 12 isolates resistant to carbapenems and polymyxin B with changes in the chromosomal gene *mgrB* had their genome all sequenced. The sequencing data were processed and analyzed using appropriate bioinformatics tools (<https://patricbrc.org>; <http://www.genomicepidemiology.org>; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), being compared with deposited reference strings. Genes reported to be responsible for polymyxin resistance, such as *mgrB*, *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP* and *phoQ* were also analyzed with the data generated by sequencing the entire genome.

The 11 clinical isolates with altered *mgrB* (amplicon with increased molecular size) had their NGS data analyzed on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) platform for similarity to the reference sequences. Thus, it was possible to identify 5 different IS families: 5 isolates interrupted by IS5 family sequences (45.5%), 3 isolates from the ISKpn13 family (27.3%) and 1 isolate from the respective families: IS1, IS3 and ISKpn26. A single isolate did not show amplification of the *mgrB* gene, and the deletion was confirmed by sequencing the complete genome. To our knowledge, these are the first reports of insertion of IS3 and total deletion mutating the *mgrB* gene, in isolates from Brazil.

Although the results of the PCR technique with primers for the other genes related to chromosomal resistance to polymyxin (*pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP* and *phoQ*) indicated that all were present and that there was no change in molecular size, it was possible to identify *missense* mutations and silent by analyzing the complete genome sequencing data. The mutations found included: *pmrA* - *missense* mutation in isolate 4110 (L64R, D167E); *pmrB* - *missense* mutation in isolate 966 (S164P) and isolate 3854 (V300F), *missense* and silent mutations in isolate 4110 (A84G, G111V, P145P, L233L); *pmrD* - silent mutation (L25L); and *phoQ* - silent mutation in isolate 4110 (I148I, S301S, D416D).

In addition to genes related to polymyxin resistance, other genes were identified from in silico analysis of sequencing data for the entire genome: *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} (expected result since the isolates were resistant to carbapenems), aminoglycoside-modifying enzymes including acetyltransferases, phosphotransferases and nucleotidyltransferases; *tet* genes that confer resistance to tetracyclines as well as *bla*_{CTX-M} that confers resistance to beta-lactams. The sequencing data confirmed that no isolate had the *mcr-1* gene.

To determine the sequence type (ST) of the isolates, the seven housekeeping genes (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* and *ton*) were evaluated in silico. Four different STs were identified, 6 isolates belonging to ST437 (50.0%), 4 isolates to ST11 (33.3%), 1 isolate to ST16 and 1 to ST340 (8.3%).

Our results corroborate previous reports on resistance, but they also indicated the complexity that may be involved, often having more than one mechanism involved in resistance. It is worth mentioning that an isolate with the *mgrB* gene with total deletion and an isolate with an IS3 insertion sequence altering the gene, both alterations not previously described in Brazil.

Key words: Antimicrobial resistance; Polymyxin; *mgrB*.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFB	Ácido Fenilborônico
AME	Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos
bp	pares de base
CC	Clonal Complex
CRE	<i>Enterobacteriales</i> Resistentes aos Carbapenêmicos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
IS	Insertion Sequence
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
KpCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Resistente aos Carbapenêmicos
L-Ara4N	4-amino-4-deoxi-L-arabinose
LPS	Lipopolissacarídeo
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MLST	Multilocus Sequence Typing
NDM	New Delhi Metallo- β -lactamase
NGS	Next-Generation Sequencing
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEtN	Fosfoetanolamina
RNA	Ácido Ribonucleico
ST	Sequence Type
WGS	Whole Genome Sequencing

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1. Ordem Enterobacterales	25
3.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	26
3.3. Polimixina	27
3.4. Resistência à polimixina	28
3.4.1 Resistência à polimixina em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
3.5. Avaliação da diversidade genética	31
3.6. Ferramentas de sequenciamento	33
4. MANUSCRITO	35
5. DISCUSSÃO	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana tem sido amplamente reportada em bacilos Gram negativos para diversas classes de antibióticos, sendo que estas bactérias podem se tornar multirresistentes (Partridge, S. R., 2015). Dentre esses germes, os de maior importância clínica pertencem a ordem Enterobacterales, e em pesquisa publicada em 2013 pelo European Centre for Disease Prevention and Control, *Klebsiella pneumoniae* foi reportada como uma das principais espécies de Enterobacterales descritas como multirresistente ao redor do mundo (ECDC, 2013).

As opções para o tratamento de *K. pneumoniae* com fenótipo resistente são restritas, por isso carbapenêmicos, amicacina, tigeciclina são drogas atualmente consideradas como “última opção de tratamento” (Karaiskos *et al.*, 2019). A emergência de *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos (CRE), fez com as polimixinas fossem reinseridas na prática clínica mesmo com os seus efeitos nefrotóxico e neurotóxico (Evans *et al.*, 1999). Polimixinas são antibióticos polipeptídeos catiônicos cujos principais representantes diferem em apenas um aminoácido: polimixina E ou colistina (possui D-fenilalanina) e polimixina B (possui um resíduo D-leucina) (Biswas, 2012). Ambas interagem com o lipopolissacarídeo da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas. Polimixinas são utilizadas no tratamento de bactérias multirresistentes em combinação com carbapenêmicos, aminoglicosídeos e tigeciclina (Karaiskos *et al.*, 2019).

Entretanto, o crescente uso de polimixina fez com que surgissem relatos de resistência, podendo ser decorrente de alterações no cromossoma da bactéria (Cannatelli *et al.*, 2013), ou pela aquisição de genes de resistência localizados em elementos genéticos móveis (plasmidial) (Liu *et al.*, 2015). De fato, as alterações (mutações) cromossomais são mais prevalentes que plasmidiais em isolados de *K. pneumoniae* com resistência mais significativa as polomixinas, ou seja, com altos valores de concentração inibitória mínima (MIC). Entre as mutações cromossomais, a alteração no gene *mgrB* é a mais comum sendo que o mecanismo envolvido é principalmente a inserção de sequências no gene, tornando-o não funcional e impossibilitando a regulação de um complexo sistema de dois componentes (Cannatelli *et al.*, 2014), permitindo modificação do lipopolissacarídeo (LPS) após a adição de 4-amino-4-deoxi-L-arabinose (L-Ara4N) ao lipídeo A, diminuindo, portanto, a afinidade das

polimixinas ao LPS pela diminuição da carga negativa da membrana (Ezadi *et al.*, 2019).

Além de sequências de inserção (IS) alterando o gene *mgrB*, outros mecanismos já foram relatados, como a deleção total do gene *mgrB*, que embora seja descrita com menos frequência em comparação com IS, também confere altos níveis de resistência à polimixina (Cannatelli *et al.*, 2014). Além da deleção, mutações nos genes *pmrA*, *pmrB*, *phoP* e *phoQ*, que compõem o sistema de dois componentes têm sido indicadas como alterações responsáveis pela resistência a polimixina, visto que também resultam na modificação no LPS e impossibilidade de ligação da polimixina à membrana celular externa (Macesic *et al.*, 2019).

É importante conhecer o *background* genético dos isolados para verificar possíveis determinantes de resistência, sendo assim, métodos moleculares como Sequenciamento do Genoma Completo (NGS) se tornam essenciais para elucidar a resistência à polimixina. Com isso, o objetivo do nosso trabalho foi elucidar o ambiente genético de isolados de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Caracterização molecular de isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes às polimixinas, recuperados de pacientes atendidos em hospitais de Porto Alegre.

2.2 Objetivos Específicos:

Avaliar a presença de alterações no gene *mgrB*, e nos demais genes relacionados à resistência às polimixinas;

Avaliar a diversidade genética dos isolados resistentes às polimixinas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Ordem *Enterobacterales*

A ordem *Enterobacterales* compreende bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos e não formadores de esporos, que se dividem em 60 gêneros e mais de 250 espécies. Dentre as famílias que compõem tal ordem, *Enterobacteriaceae* é a que apresenta as espécies mais frequentemente associadas a infecções comunitárias e infecções nosocomiais graves, especialmente quando associadas à aquisição de determinantes de resistência (Adeolu *et al.*, 2016).

Para esses microrganismos, a resistência antimicrobiana tem sido reportada para diversas classes de antibióticos, o que restringe as opções de tratamento. Os membros da ordem *Enterobacterales* podem adquirir resistência aos antimicrobianos por quatro mecanismos fundamentais: alteração na permeabilidade de membrana a um determinado composto; alteração no sítio-alvo do antimicrobiano; hiperprodução de sistemas de efluxo e produção de enzimas capazes de inativar fármacos (Allen *et al.*, 2010). A resistência aos carbapenêmicos é a mais importante no caráter epidemiológico e o fenótipo de resistência que mais impacta clinicamente, aumentando significativamente morbidade e mortalidade associadas a essas infecções (Capone *et al.*, 2014).

Carbapenêmicos, (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem, etc.) têm seu mecanismo de ação relacionado à inibição da síntese de peptidoglicano através da ligação a Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBP), culminando em um efeito bactericida (Breilh *et al.*, 2013). O mecanismo de resistência aos carbapenêmicos com maior relevância clínica e epidemiológica é a produção de enzimas, as carbapenemases, que se dividem em 3 classes. Enzimas da classe A possuem um resíduo de serina no sítio-ativo e são inibidas pelo ácido fenilborônico (AFB); a *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) é o principal exemplo de enzimas que compõem essa classe. Por sua vez, as enzimas de classe B são caracterizadas por possuírem um resíduo de zinco no sítio ativo e são inibidas por agentes quelantes, como o Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), sendo a enzima New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM) a de maior importância clínica e epidemiológica dentro do grupo. Por fim, as enzimas de classe D – oxacilinasas – têm menor capacidade hidrolítica sobre carbapenêmicos, sendo a OXA-48 uma das principais carbapenemases dessa classe (Ambler *et al.*, 1980).

A presença dessas enzimas, isoladas ou associadas a outros mecanismos de resistência, caracteriza germes multirresistentes (GMR), para os quais as opções terapêuticas são limitadas. De fato, o tratamento de infecções causadas por *Enterobacterales* Resistentes aos Carbapenêmicos (CRE) é desafiador e fundamenta-se na combinação de diferentes classes: essencialmente, são utilizadas polimixinas associadas a aminoglicosídeos, tigeciclina ou carbapenêmicos (Peri *et al.*, 2019). Representados clinicamente por estreptomicina, amicacina e gentamicina, os aminoglicosídeos atuam ligando-se irreversivelmente à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, inibindo a síntese proteica (Serio *et al.*, 2018). As bactérias se tornam resistentes a esses antimicrobianos através da alteração no sítio de ligação da droga ou, principalmente, pela inativação do antimicrobiano, pelas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AME). Tais enzimas são codificadas por genes localizados em elementos genéticos móveis, sendo, portanto, facilmente dissemináveis (Doi *et al.*, 2016; Ramirez *et al.*, 2010). As AMEs são classificadas de acordo com a molécula que utilizam para modificar os fármacos, podendo ser acetiltransferases (AAC), fosfotransferases (APH) e nucleotidiltransferases (ANTs ou AADs). Acetiltransferases do tipo *aac(6')-Ib-cr* são especialmente importantes pois conferem resistência também aos antibióticos da classe das quinolonas (Robicsek *et al.*, 2006).

3.2 *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella* pertence à ordem *Enterobacterales*, compondo a família *Enterobacteriaceae*, sendo *Klebsiella pneumoniae* a principal espécie do gênero. Dados publicados em 2013 pelo European Centre for Disease Prevention and Control, reportou *K. pneumoniae* como uma das principais espécies de *Enterobacterales* multirresistentes reportados ao redor do mundo (ECDC, 2013). A elevada prevalência dessa espécie em infecções humanas associada à alta frequência de isolamento de cepas multirresistentes e à facilidade de disseminação de determinados grupos clonais reforça a importância da *K. pneumoniae* no cenário mundial (Munoz-Price *et al.*, 2013).

Diversos são os antibióticos para o tratamento de *Klebsiella pneumoniae*, em especial as cepas mais resistentes, sendo que carbapenêmicos, aminoglicosídeos e tigeciclina são drogas atualmente

consideradas como “última opção de tratamento”. Com o aumento do uso desses antibióticos tem se evidenciado, no entanto, o surgimento de relatos de microrganismos resistentes à todas as classes de antibióticos, e ainda à polimixina, o que impacta diretamente na atual indicação terapêutica, visto que a polimixina é atualmente indicada para uso em tratamento combinado com carbapenêmicos, tigeciclina ou aminoglicosídeos. (Cannatelli *et al.*, 2013; Olaitan *et al.*, 2014; Bassetti *et al.*, 2018; Karaiskos *et al.*, 2019). Em casos de resistência à polimixina, novos fármacos, mas com mecanismos de ação tradicionais, como Ceftazidime-Avibactam, Meropenem-Vaborbactam, Plazomicina e Eravaciclina estão sendo utilizados na clínica médica como opção de tratamento (Karaiskos *et al.*, 2019).

3.3 Polimixinas

Em 1947, foi isolado de *Paenibacillus polymyxa* o composto atualmente conhecido como polimixina B, enquanto a colistina (polimixina E) foi isolada em 1949, a partir de *Paenibacillus polymyxa* subsp. *colistinus*. Em 1950, as polimixinas foram inicialmente utilizadas clinicamente no Japão e na Europa, e em 1959, a colistina E, na forma de uma pró-droga (colistimetato de sódio), foi utilizada para tratar infecções por bacilos Gram-negativos nos Estados Unidos. Entretanto, na década de 1980, a utilização clínica das polimixinas foi consideravelmente reduzida, já que elas apresentavam uma toxicidade expressiva, especialmente nefrotoxicidade e neurotoxicidade (Ezadi *et al.*, 2019). Assim, essa classe foi rapidamente substituída por antimicrobianos de menor toxicidade. Contudo, com o aumento da disseminação de bactérias multirresistentes na década de 90, especialmente as CRE, a escassez de antimicrobianos eficazes justificou o retorno das polimixinas como opção de tratamento (Ezadi *et al.*, 2019).

As polimixinas são antibióticos polipeptídeos catiônicos que diferem em somente um aminoácido: a colistina (polimixina E) possui D-Fenilalanina na posição 6 da molécula, enquanto a polimixina B possui um resíduo D-Leucina (Biswas *et al.*, 2012). Consistem em um heptapeptídeo, um segmento tripeptídico linear e uma cauda de ácido graxo, possibilitando a existência de regiões com caráter hidrofóbico e hidrofílico, essencial para a sua atividade

antimicrobiana, permitindo a interação com o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas (Ezadi *et al.*, 2019).

As polimixinas interagem com a membrana externa das bactérias Gram-negativas e devido a sua carga positiva, se ligam aos grupos fosfato negativamente carregados do lipídeo A do LPS. Com isso, deslocam os cátions divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} e desestabilizam o LPS, conseqüentemente alterando a permeabilidade da parede celular e levando ao extravasamento do conteúdo citoplasmático e lise bacteriana (Biswas *et al.*, 2012).

3.4 Resistência à polimixina

As bactérias podem se tornar resistentes às polimixinas empregando estratégias que incluem: (i) alterações no lipopolissacarídeo (LPS), levando a modificações na fração de lipídeo A por meio de adição de grupamentos 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) e fosfoetanolamina (PEtN) e conseqüente redução da carga negativa; (ii) utilização de sistemas de efluxo para expelir o antibiótico para o meio externo da célula; e (iii) formação de cápsulas, impedindo a ligação do antibiótico à parede celular. Dentre esses, o mecanismo mais importante é a adição dos grupamentos químicos no Lipídeo A e isso ocorre em conseqüência de mutações em genes cromossômicos ou por aquisição de genes plasmidiais (*mcr*) (Campos *et al.*, 2004; Raetz *et al.*, 2007; Padilla *et al.*, 2010).

3.4.1 Resistência às polimixinas em *K. pneumoniae*

O principal mecanismo cromossômico de resistência às polimixinas em *K. pneumoniae* é mediado pela modificação do LPS após a adição de 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) ao lipídeo A, que diminui a afinidade das polimixinas ao LPS, já que reduz a carga negativa da membrana a praticamente zero. Esta modificação depende de produtos do operon *pmrHF/JKLM* – também chamado de *arn* – que é regulado positivamente pelos sistemas de sinalização de dois componentes PhoQ/PhoP e PmrA/PmrB (Helander *et al.*, 1996; Olaitan *et al.*, 2014). A ativação do sistema de sinalização PhoQ/PhoP induz a produção da proteína transmembrana MgrB, que exerce feedback negativo no sistema de sinalização por interação direta com a quinase, controlando a fosforilação de PhoP e a ativação do sistema de sinalização de dois componentes PmrA/PmrB

(Lippa e Goulian, 2009). A inativação do gene *mgrB*, que ocorre majoritariamente pela inserção de sequências específicas no gene, levando a uma indução constitutiva do sistema de dois componentes PhoP/PhoQ e consequente regulação positiva do operon *pmrHFIKLM*, que altera o LPS através da adição de L-Ara4N. Já, a indução constitutiva do sistema de dois componentes por mutação nos sistemas PmrA/PmrB e consequente regulação positiva do operon *pmrCAB* altera o LPS através da adição de PEtN ao lipídeo A (Olaitan, 2014).

As sequências de inserção (IS) que, quando inseridas no gene *mgrB*, alteram a sua função são elementos transponíveis muito simples, os quais não carregam nenhuma outra informação genética além da necessária à sua inserção em um local determinado. Assim, as IS são compostas por genes que codificam uma transposase e duas pequenas sequências de repetições terminais, uma direta e outra invertida, localizadas nas extremidades da transposase. As IS encontram-se distribuídas ao longo do cromossomo, variando na frequência com que são encontradas, podendo estar presente em diversas cópias em um único cromossomo (Schleinitz *et al.*, 2010).

A inativação de gene *mgrB* por uma IS é um importante mecanismo associado a resistência à polimixina (Cannatelli *et al.*, 2014). Macesic e colaboradores (2019) demonstraram que 24,4% de isolados de *K. pneumoniae* resistentes as polimixinas apresentaram alteração no gene *mgrB* causado por inserção de IS. Dentre as sequências que interrompem o gene *mgrB*, IS5 é a mais comumente relatada, tendo sido isolada em diversos países, incluindo o Brasil (Aires *et al.*, 2016; Cannatelli *et al.*, 2014; Lomonaco *et al.*, 2018).

Outras IS também têm sido relatadas em estudos de caracterização molecular do gene *mgrB*. ISKpn13 foi descrita em isolados recuperados na França, Turquia, Colômbia e África do Sul (Poirel *et al.*, 2014), mas também em isolados de *K. pneumoniae* recuperados na Grécia e no Brasil (Pitt *et al.*, 2018). Uma sequência da família IS1 foi descrita em 2018 por Uz Zaman e colaboradores na Arábia Saudita e, no mesmo ano, no Sul do Brasil, por Zavascki e colaboradores. Por sua vez, genes *mgrB* interrompidos por IS903 já foram descritos na Arábia Saudita (Uz Zaman *et al.*, 2018), Itália (Esposito *et al.*, 2018) e Brasil (Aires *et al.*, 2016). De fato, juntamente com a IS5, IS903 parece ser a mais frequentemente presente em isolados brasileiros de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos (Aires *et al.*, 2016).

IS3, ISKpn14, ISKpn18, ISKpn25, ISKpn26 e ISKpn28 também já foram relatadas mundialmente, embora com menos frequência, causando inativação do gene *mgrB*, e consequente resistência à polimixina (Halaby *et al.*, 2016; Uz Zaman *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2018; Pitt *et al.*, 2018; Lomonaco *et al.*, 2018; Aires *et al.*, 2016).

A presença de IS não é a única alteração no gene *mgrB* capaz de levar à resistência às polimixinas. Há, por exemplo, relatos de deleção total do *mgrB*, levando, obviamente à resistência a esses antibióticos (Cannatelli *et al.*, 2013; Giani *et al.*, 2015; Leung *et al.*, 2017; Bernasconi *et al.*, 2018; Macesic *et al.*, 2019).

Embora as alterações no *mgrB* sejam o principal mecanismo observado em *K. pneumoniae*, a resistência às polimixinas pode ocorrer devido a alterações em qualquer um dos demais genes envolvidos nas modificações do LPS, incluindo os genes dos sistemas de dois componentes – *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP* e *phoQ* – que levariam a uma ativação constitutiva dos operons associados a inserção de grupos positivos no lipídeo A, resultando em modificação no LPS (Olaitan *et al.*, 2014). De fato, mutações nos genes dos sistemas de dois componentes já foram relatadas por diversos autores. Haeili e colaboradores (2017) por exemplo, relataram mutações *missense* no gene *pmrB* em 19 de 20 isolados pesquisados. Pitt e colaboradores publicaram em 2018 um estudo com isolados resistentes às polimixinas provenientes do Brasil e da Grécia e encontraram mutações nos genes *pmrA*, *pmrB*, *phoP* e *phoQ* de *K. pneumoniae*. Resultados semelhantes foram relatados por Yang e colaboradores (2018) e Xiaoliang e colaboradores (2019).

Macesic e colaboradores publicaram em 2019 um grande estudo realizando o sequenciamento do genoma completo de 388 isolados de *K. pneumoniae* provenientes de um hospital terciário localizado na cidade de Nova York, nos Estados Unidos, sendo 164 isolados resistentes à polimixina. Esses autores encontraram diversas mutações *missense*, *nonsense* e *neutras* em todos os sistemas de dois componentes – *pmrA*, *pmrB*, *phoP* e *phoQ*. No Brasil, as principais mutações associadas aos genes são: *pmrA* (E57G), *pmrB* (R256G e T246A) e *phoP* (A30S) (Aires *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2019).

Para além de todas essas complexas modificações em genes cromossômicos, a resistência às polimixinas pode, também, estar associada a

presença de genes localizados em plasmídeos. É o caso do gene *mcr-1*, que foi reportado inicialmente em novembro de 2015 por Liu e colaboradores em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* recuperados de animais e de humanos de provenientes da China (Liu *et al.*, 2015). Já em junho de 2016, foi relatado na Bélgica a existência do gene *mcr-2* em isolados bacterianos de animais (Xavier *et al.*, 2016). Desde então, até 2020, foram relatadas oito variantes do gene *mcr*: *mcr-1*, *mcr-3*, *mcr-7* e *mcr-8*, descritos pela primeira vez na China (Liu *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018), *mcr-2*, relatado inicialmente na Bélgica (Xavier *et al.*, 2016), *mcr-4* na Itália, Espanha e Bélgica (Carattoli *et al.*, 2017) e *mcr-6*, na Grã-Bretanha (AbuOun *et al.*, 2017). MCR é uma proteína da família de enzimas transferases que adiciona um grupo fosfoetanolamina ao lipídeo A. Por estar localizado em um elemento genético móvel e poder ser transferido horizontalmente, o gene *mcr* dissemina-se rapidamente e já foi reportado mundialmente (Gao *et al.*, 2016; Irrgang *et al.*, 2016; Prim *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2016; Ellem *et al.*, 2017). Os genes *mcr* estão associados a plasmídeos de diferentes grupos de incompatibilidade. Inicialmente, o gene *mcr-1* foi descrito no grupo de plasmídeos IncI2, porém, estudos posteriores indicaram que o gene *mcr-1* não é restrito apenas a esse grupo plasmidial, sendo encontrado também em IncX4, IncHI2, IncI2, IncHI1 e p0111 (Hasman *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2020).

3.5 Avaliação da diversidade genética

A disseminação de microrganismos multirresistentes pode ocorrer pela expansão clonal de linhagens específicas (disseminação clonal), ou através do compartilhamento de material genético ou alterações cromossômicas ocorrendo em isolados bacterianos com *background* genéticos distintos. Nesse último caso, há uma diversidade genética considerável entre os isolados compartilhando entre si poucas características, além do fenótipo de resistência (Urwin, R. and Maiden, M. C., 2003).

Uma das ferramentas utilizadas para avaliar a diversidade genética de isolados é o MLST, o qual tem como vantagens a não ambiguidade de dados e a capacidade de comparação com dados mundiais, através do compartilhamento de informações em bancos de dados (Maiden *et al.*, 1998)

A partir da técnica convencional de MLST, é definida a Sequence Type (ST) da qual faz parte a bactéria em questão. As STs são definidas pela avaliação dos alelos de genes *housekeeping*. Estes genes são amplificados e sequenciados individualmente e isso permite definir os diferentes tipos de sequências que caracterizam um determinado perfil alélico (ou ST) de isolados de uma mesma espécie (Maiden *et al.*, 1998; Urwin *et al.*, 2003). A determinação de ST também pode ser feita pela avaliação *in silico* dos dados obtidos no sequenciamento de todo o genoma bacteriano (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>).

Para *K. pneumoniae* são 7 genes avaliados para determinação das STs, sendo eles: *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* e *ton* (<http://www.genomicepidemiology.org/>). STs semelhantes agrupam-se num mesmo complexo clonal (CC).

O CC258, por exemplo, tem disseminação e importância mundiais, uma vez que já foi descrito nas mais diferentes regiões geográficas e que está relacionado a isolados de *K. pneumoniae* multirresistentes. Esse CC é composto pelas seguintes STs: ST 258, ST11, ST340 e ST512 (Peirano *et al.*, 2017).

A ST11 foi relatada na China em 2017 por Zhang e colaboradores, associada à disseminação de uma cepa de *K. pneumoniae* produtora da *bla*_{KPC-2}, e em 2019 por Xiaoliang e colaboradores, associada a morte de um paciente com infecção de corrente sanguínea por um isolado de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e à polimixina. Pitt e colaboradores (2018) sequenciaram isolados provenientes do Brasil e encontraram cepas pertencentes a ST11, além da ST437. Boszczowski e colaboradores (2019) reportaram um isolado de *K. pneumoniae* resistente a polimixina pertencente à ST 340 proveniente de um hospital terciário na cidade de São Paulo.

Macesic e colaboradores encontraram uma alta prevalência do CC258, sendo a ST258 presente em 301 dos 388 isolados pesquisados, e ainda, ST17 ST307 e ST392 sendo outras STs de importante incidência (Macesic *et al.*, 2019).

A ST16 foi recentemente descrita em um caso de disseminação clonal em São Paulo, como sendo uma ST importante na disseminação de um clone de alto risco associado a resistência à polimixina, embora não tendo relação com o CC258 (Andrey *et al.*, 2019).

3.6 Ferramentas de Sequenciamento

O sequenciamento de genes bacterianos permite, dentre outros, avaliar a presença de alterações, tais como mutações ou presença de IS. Ao longo das últimas décadas, foi observado um avanço significativo nas metodologias de sequenciamento.

Primeiramente, em meados da década de 70, foi desenvolvido o método de dideoxi de Sanger, o qual se baseia em uma metodologia enzimática, onde são gerados fragmentos de DNA de tamanhos variados, marcados com fósforo, que são, posteriormente, submetidos à eletroforese em gel. A técnica exige iniciadores com sequências conhecidas e as plataformas disponíveis para o sequenciamento de Sanger são MegaBACE (Amersham Biosciences) e ABI Prism (Applied Biosystems) (França *et al.*, 2002).

Posteriormente, o sequenciamento foi aprimorado, aumentando o volume de dados fornecido em uma única corrida de sequenciamento e reduzindo o custo em comparação com o volume de dados gerados no sequenciamento de Sanger. O sequenciamento de nova geração (NGS), também conhecido como Sequenciamento de Segunda Geração, baseia-se na obtenção de uma biblioteca genômica para sequenciar o genoma completo, a biblioteca é composta por pequenos fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA) da amostra a ser sequenciada. A seguir, a amplificação desses fragmentos é realizada através de PCR em emulsão, utilizando-se um único par de iniciadores e o sequenciamento simultâneo destes produtos de amplificação. Ao final, os fragmentos são montados por referência ou “de novo”. Na montagem por referência, utiliza-se um genoma conhecido, sendo as reads obtidas através do sequenciamento, alinhadas contra o genoma de referência. Na montagem “de novo”, não existe uma referência e as reads são montadas por similaridade (Bentley *et al.*, 2008).

Diversas plataformas de NGS estão disponíveis, e o que as diferencia é a tecnologia utilizada para a detecção da incorporação de novos nucleotídeos e o tamanho do fragmento sequenciado. A plataforma 454 (Roche) utiliza o pirosequenciamento baseado em reações de fluorescência para a detecção da incorporação de nucleotídeos. O MiSeq (Illumina) utiliza o sequenciamento baseado em síntese, utilizando marcação com fluoróforos para a detecção das

diferentes bases incorporadas. A plataforma Ion Torrent (ThermoFischer) se baseia na modificação de pH causada pela incorporação de nucleotídeos à cadeia e consequente liberação de íons H^+ (Pareek *et al.*, 2011).

A terceira e quarta gerações de sequenciamento são respectivamente representadas pelas plataformas PacBio e Nanopore. A tecnologia PacBio utiliza sequenciamento por síntese, enquanto a tecnologia Nanopore utiliza sinal elétrico para detecção das bases incorporadas. Rapidez, precisão e versatilidade são as principais vantagens fornecidas pelas novas plataformas de sequenciamento.

4. MANUSCRITO

Evaluation of the molecular context of polymyxin resistant *Klebsiella pneumoniae* from patients attending tertiary hospitals in southern Brazil.

Lisiane Rech Pancotto^{a,b}, Juliana Caierão^c, Daiana de Lima-Morales^b, Priscila Lamb Wink^b, Afonso Luís Bartha^{b,c}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre RS, Brazil

^b Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre RS, Brazil;

^c Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre RS, Brazil;

Corresponding author: Afonso Luís Barth, LABRESIS – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre RS, Brazil. 90.035-903. E-mail: albarth@hcpa.edu.br. Phone: +555133598607.

Abstract

Antimicrobial resistance is a global concern, particularly multiresistant Gram-negative bacilli. Chromosomal resistance to polymyxins is mainly due to alterations in the *mgrB* in *Klebsiella pneumoniae*, however, mutations in the two-component systems (*PmrAB*, *PhoPQ*) also play an important role in the complex system associated. The objective of this study was to evaluate the molecular context related to polymyxin B resistant *K. pneumoniae*. A total of 35 isolates resistant to carbapenems and polymyxin B was analyzed. All 35 *K. pneumoniae* carried *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP* and *phoQ* genes with the expected size, indicating that no partial deletion or insertion occurred in these genes. None of the 35 isolates presented positive results for the *mcr-1* gene. The PCR for the *mgrB* gene was positive in 34 out of 35 isolates evaluated. 11 *K. pneumoniae* isolates presented *mgrB* amplicons with increased size (around 1500bp) which is compatible with the presence of IS in the gene, and one isolate presented a negative

result in the PCR for the *mgrB* gene, suggesting total deletion of the gene. All 12 isolates with alterations in the *mgrB* gene were sequenced by Whole Genome Sequencing (WGS). A total of 11 isolates presented IS in *mgrB*: IS5 was observed on 5 isolates, ISKpn13 on 3 isolates, IS1, IS3 and ISKpn26 on 1 isolate each, and the total deletion of one isolate was confirmed. Regarding other genes, missense mutation and silent mutation was found on *pmrA* and *pmrB* and silent mutation was found on *phoQ*. Molecular characterization of isolates is important to elucidate the mechanism associated to polymyxin resistance.

Introduction

Antimicrobial resistance has become a subject of major concern and the Center for Disease Control and Prevention and World Health Organization recognize it as an urgent public health worldwide threat requiring immediate and aggressive action (1,2,3). Indeed, the occurrence and dissemination of multidrug resistant microorganism is a challenge which needs to be faced (4). *Klebsiella pneumoniae* is one of the main species among Enterobacterales and is usually reported as multidrug-resistant all over the world (5). Therapeutic options for infections due to *K. pneumoniae* resistant to carbapenems (KpCR) are restricted as isolates of KpCR are frequently pan-resistant (6). Due to the lack of new active antibacterial agents, the “old” polymyxins are considered nowadays a last resort for KpCR infections regardless the toxicity of these drugs. However, even polymyxins may not be effective to treat some KpCR, as resistance to this class of antimicrobials is increasing (7).

The exact mechanism of action of polymyxins is unknown, however, it is assumed that the drug kills bacteria by binding the Lipid A of the Lipopolysaccharide, disrupting bacterial outer and inner membranes through competitive displacement of divalent cations (Ca^{2+} and Mg^{2+}) (8). Resistance to Polymyxins in *K. pneumoniae* is usually due to modification of the LPS structure. Mutations in chromosomal genes of the regulation

pathways of Lipid A, such as *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP*, *phoQ*, and *mgrB* are more common than a plasmidial mechanism which is due to the *mcr* genes (9).

Inactivation of *mgrB* gene due to mutations, presence of Insertion Sequences (IS) or the complete deletion of the gene, causing an activation of the PhoPQ and PmrAB signaling system and the consequent upregulation of operons associated to modifications of Lipid A, appears to be an important molecular mechanism of polymyxins resistance in *K. pneumoniae* (10, 11, 12, 13).

This study aimed to characterize the molecular context of polymyxin resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered from patients attended in tertiary hospitals in southern Brazil.

Materials and Methods

Bacterial isolates and Resistance Characteristics

We evaluated 35 *K. pneumoniae* isolates resistant to carbapenems and polymyxin B recovered from patients attended three hospitals in Porto Alegre city, southern Brazil, during the period of April 2013 to August 2015 and were maintained in freezer at -80°C. Isolates were selected for convenience and all was carbapenemase-producing and non *mcr-1*-producing. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of polymyxin B was determined by Broth Microdilution, according to the ISO 20776-1 (14). Polymyxin B sulfate (Sigma-Aldrich, Germany) and Cation-adjusted Mueller-Hinton II broth (BD Difco, USA) were used for the experiments. *Escherichia coli* ATCC 25922 was used for quality control. MIC of Polymyxin B ≤ 2 µg/mL defined the isolate as susceptible (EUCAST).

Polimerase Chain Reaction (PCR) for genes related to Polymyxin B resistance

In order to detect integrity and size of *mgrB*, *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP* and *phoQ*, genes a simplex PCR was set using specific primers. Amplicons expected size, primers and reaction conditions were previously described (10, 15). Isolates carrying a wild copy

of mgrB present an amplicon with 144 bp, while mgrB interrupted by IS presented amplicons with higher molecular size, with the specific size depending on the IS present.

mgrB Sequencing

The amplicons of isolates carrying alterations on mgrB with an amplicon with molecular size higher than 144 bp, possible due to IS, were sequenced in an ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, California, EUA). The amplicons were labelled with 3.2 pmol of specific primers and 1 µL of the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) in a final volume of 10 µL. The obtained sequence was compared to the deposited sequences in the following databases: ISfinder and NCBI.

Genome Sequencing

In order to understand the genomic context of *K. pneumoniae*, isolates carrying IS in mgrB, confirmed by Sanger Sequencing, were submitted to whole genome sequencing. Genomic DNA was extracted and the library was made with the Nextera® XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA), followed by DNA quantification on TapeStation (Agilent) and sequencing in the MiSeq Platform (Illumina, San Diego, CA).

De novo assembled and annotation was performed using Patric (<https://patricbrc.org/>), annotation uses RAST tool Kit. To determine the IS, the NCBI platform was used analyzing percent identity, E value and query coverage.

Multilocus Sequence Type (MLST)

MLST analysis was carried out by the in-silico analysis of WGS considering the seven housekeeping genes: gapA, infB, mdh, pgi, phoE, rpoB e tonB according to the Center for Genomic Epidemiology (www.genomicepidemiology.org; 16) and minimum identity of genes was 99.0%.

Other Resistance Genes

Detection of other resistance genes, on isolates submitted to NGS, was carried out using ResFinder platform on Center for Genomic Epidemiology (www.genomicepidemiology.org; 17). Parameters of selected ID threshold was 90.0% and selected minimum length was 60.0%.

Results

The polymyxin B MIC of all 35 *K. pneumoniae* varied from 4 to 64 µg/mL, indicating resistance to the antibiotic. 3 isolates (8.6%) range 4 µg/mL, 7 isolates (20.0%) range 8 µg/mL, 12 isolates (34.3%) range 16 µg/mL, 10 isolates (28.6%) range 32 µg/mL and 3 isolates (8.6%) range 64 µg/mL.

All isolates carried *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP* and *phoQ* genes with the expected molecular size, indicating that no partial deletion or insertion occurred in these genes. The PCR for the *mgrB* gene was positive in 34 out of 35 isolates evaluated. Twenty-three (67.6%) isolates presented amplicons with molecular size of around 144bp which indicates an intact *mgrB* gene. On the other hand, 11 (32.4%) *K. pneumoniae* isolates presented *mgrB* amplicons with increased size (around 1500bp) which is compatible with the presence of IS disrupting *mgrB*. One isolate presented a negative result in the PCR for the *mgrB* gene, suggesting total deletion of the gene. MIC of Polymyxin B for these isolates was 16 µg/mL or higher, indicating a high level of resistance to the antibiotic.

The draft genomes comprised from 5 507 407 to 5 970 700 bp with a GC content of 56.61to 57.26%. A total of 408 to 736 contigs were generated and the N50 value varied from 203939 to 302846.

Based on data from the WGS, it was possible to identify that the *mgrB* gene were interrupted by five different IS: IS5 in five isolates (45.5%), cluster ISKpn13 in three isolates (27.3%) and one isolate (9.1%) of each with the following sequences: IS1, IS3 and ISKpn26 (Table 1).

In-silico analysis of the WGS regarding the genes of MLST indicated that isolates with *mgrB* interrupted by IS and the one without the *mgrB* gene belonged to four different STs. Although most *K. pneumoniae* (n=6; 50%) belonged to ST437, another three STs were identified: ST11 (n=4; 33.3%), ST16 (n=1; 8.3%) and ST340 (n=1; 8.3%). Noteworthy, the isolate with total deletion of the *mgrB* clustered in the ST11 (Table 1).

All 11 isolates with insertions in the *mgrB* gene also presented the *blaKPC* gene and the isolate with total deletion of the *mgrB* gene presented the *blaNDM* gene. Besides that, several other resistance genes were identified by WGS analysis among isolates harboring IS in the *mgrB* region, reinforcing the multiresistant phenotype of these bacteria. These genes included aminoglycoside modifying enzymes (AME), such as *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib-cr*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *aac(6')-Ib3*, *aadA1* and *aadA2*. Enzymes that hydrolyze beta-lactams (CTX-M, SHV, OXA and TEM) were also found, as we expected, besides the KPC-2 and NDM, and also genes that confer resistance to tetracycline, as presented in Table 1.

Beyond *mgrB* alterations, mutations on other genes previously related to polymyxin resistance were also observed. Isolate 4110 presented several mutations – missense mutation and silent mutation – on genes *pmrA*, *pmrB*, *pmrD* and *phoQ*, isolates 966 and 3742 presented only one missense mutation each and only in *pmrB* (Table 2).

Discussion

Despite the worrying and well-recognized toxicity of polymyxins, these antibiotics are used as last line drugs for the treatment of CRE. However, resistance to polymyxins has been described worldwide and further aggravate the situation. In fact, polymyxins resistance is associated to complex molecular mechanisms, related to alterations in several chromosomal genes or to the presence of plasmid-mediated *mcr-1*. Among *K. pneumoniae*, *mgrB* seems to be the major target for mutations, insertions, or even total deletion, which led to polymyxins resistance.

Insertion Sequences inactivating *mgrB* has been described as the main mechanism associated with polymyxin resistance in *K. pneumoniae* (10). We found 32.4% of isolates evaluated in this study harboring the *mgrB* gene interrupted by IS. Our data reinforces the importance of IS as a cause of *mgrB* inactivation and the consequent decrease of the negative charge of Lipid A, where polymyxin B will not be able to effectively bind.

Among ISs already described in *mgrB*, IS5 seems to be the the most related IS, being described in many countries, including in Brazil, where, along with IS903, it is the main sequence associated with polymyxin resistance (13, 18, 19). Our data corroborate the frequent reporting of IS5 disrupting *mgrB*. In fact, we found IS5 in isolates recovered throughout the study period and in all hospitals surveyed.

The second most common IS found in our study was ISKpn13, which was identified in three isolates from the same hospital in a period of only four months, two isolates belonged to ST11 and one isolate to ST16. ISKpn13 altering *mgrB* was previously related by Poirel et al. in 2015 (13) on an isolate of *K. pneumoniae* ST1271 from Colombia and later, by Pitt et al. in 2018 (20) on an isolate ST11 from São Paulo, Brazil, collected from 2012 to 2014.

We also found, but in a lesser extent, IS1, IS3 and ISKpn26 on *mgrB* sequences of *K. pneumoniae* included in this study. IS1 and ISKpn26 were previously reported around the world, including Brazil, interrupting *mgrB* in *K.pneumoniae* isolates (18, 20). Noteworthy, Zavascki et al. (15) reported a *K. pneumoniae* isolate carrying IS1 on *mgrB* in Porto Alegre, Brazil. IS3 has been already described in India and The Netherlands (21, 22), and to the best of our knowledge this is the first report of IS3 interrupting *mgrB* sequence described in Brazil.

We found only one isolate with a total deletion on *mgrB* gene that was indicated by a lack of amplicon by PCR and confirmed by WGS due to the fact that it was not possible to identify this gene by in silico analysis of the entire genome. Complete deletion of *mgrB* is not a common mechanism associated with polymyxins resistance and has

been related sporadically around the world (10, 23, 24, 25, 26). In fact, total deletion of the *mgrB* was not described before in Brazil.

The first cases of carbapenem resistance among *K. pneumoniae* tended to present a clonal dissemination, although this pattern no longer exists. Indeed, isolates presenting *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) are disseminated worldwide and associated related to the ST11, which is part of the clonal complex 258 (CC258), along with ST258, ST340 and ST512 (27), and ST11 has also been described harboring New-Delhi metalobetalactamase (NDM) enzyme.

Likewise, polymyxin resistance seems to be frequently related to STs of the CC258, and according to our results, four isolates belonged to ST11 (33.3%) and one isolate to ST340 (8.3%).

Pitt et al. (20) published a study reporting strains of polymyxin-resistant *K. pneumoniae* from Brazil belonging ST11 and ST437, and on the same way, those ST appear in our isolates, representing six and four isolates, respectively. ST11 seems to be the most widespread in the world and was recently reported by Xiaoliang et al. (28), associated with the death of a patient with a bloodstream infection by an isolate of *K. pneumoniae* resistant to polymyxin in China. ST 340 (CC258) was already reported by Boszczowski et al. (29) in Brazil. Andrey et al. (30) reported for the first time in Brazil an outbreak of *K. pneumoniae* ST16 which was associated with Polymyxin B resistance causing bloodstream infection with high mortality rates in São Paulo, Brazil.

Clonal dissemination of bacterial isolates resistant to antibiotics is a concern in hospitals (30, 31). According to our results, considering that all isolates were preventive from different patients it is reasonable to consider that a specific clone KpCR resistant to Polymyxin B may have spread in hospital 2 as the three isolates obtained from this hospital belonged to the same ST (ST437) and presented the same IS (IS5). Moreover, two of these three isolates were obtained in the same month (October 2013). Another possible clonal dissemination can be considered in Hospital 3 as two isolates ST11

(mgrB by the same ISKpn13) were obtained in a period of 3 months. The isolate that presented IS3 on mgrB belongs to ST11, a sequence responsible for high dissemination.

The optimal treatment for KpCR resistant to polymyxin B is not well established and combination therapies with polymyxins and aminoglycosides or tigecycline or carbapenems can be used if they present susceptibility in vitro (32). However, in our study we found the KpCR resistant to polymyxin B to present several other resistance genes which may lead to resistance to aminoglycosides and tetracyclines.

On the other hand, it must be considered that alterations in mgrB other than IS in the polymyxin B resistance mechanisms are also important. In fact, alterations in mgrB due to mutations in canonical genes are also responsible for polymyxin B resistance (26). Diverse canonical genes mutations were described in isolates resistant to Polymyxin B and included missense, nonsense and silent mutations in pmrA, pmrB, phoP, phoQ, among other genes (20, 26, 28, 33, 34). We have found mutations that have not been described yet in canonical genes: pmrA – missense mutation on 4110 isolate (E167G) and silent mutation on 4110 isolate (R64R); pmrB – missense mutation on 966 isolate (S163P) and 3742 (V299F), missense and silent mutations on 4110 isolate (A84A, G110R, P145P, L233L); pmrD – silent mutation (L25L); and phoQ – silent mutation on 4110 (I148I, S301S, D416D). It has been described previously that R256G and T246A are the main mutation associated to pmrB in Brazil (18, 35), but we did not find these mutations in the isolates evaluated in this study.

Noteworthy, the isolate 4110 was the only isolate KpCR resistant to polymyxin B in our study which belonged to the ST16. One can consider that ST16 is a “high-risk” clone which may be able to genetic recombination, presenting more mutations.

Finally, although the resistance to polymyxin in 32.4% of our isolates could be justified by the presence of mechanisms already described that inactivate the mgrB gene, 67.6% of the resistant isolates did not show any mutation in the gene. These results reinforce that polymyxin resistance is a result of complex mechanisms evolving distinct genetic systems requiring further studies.

Funding

This study was financed by Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência a Antimicrobianos (INPRA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA).

Acknowledgments

The authors would like to thank the Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência a Antimicrobianos, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Author Disclosure Statement

The authors declare to have no conflict of interest.

Ethical approval

Not required.

References

1. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report. 2019. World Health Organization. Available at www.apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/279656/9789241515061-eng.pdf?ua=1.
2. Center for Disease Control. 2013. Antibiotic resistance threats in the U.S. Available at www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf.
3. World Health Organization. 2015. The World Health Statistics 2015. Geneva:WHO. Available at https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/170250/9789240694439_

eng.pdf;jsessionid=B1D174FAB7E6D0CBC9B42A7924158181?sequence=1.

4. Kaye, K.S.; Pogue, J.M.; Tran, T.B.; Nation, R.L.; Li, J. 2016. Agents of Last Resort: Polymyxin Resistance. *Infect Dis Clin North.* 30(2):391-414.

5. European Centre for Disease Prevention and Control. 2013. Point Prevalence Survey of Healthcare associated Infections and Antimicrobial Use in European Acute Care Hospitals. Stockholm: ECDC. Available at www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/healthcare-associated-infectionsantimicrobial-use-PPS.pdf.

6. Munoz-Price, L. S.; Poirel, L. Bonomo, R. A.; Schwaber, M. J., Daikos, G. L.; Cormican, M.; Cornaglia, G.; Garau, J.; Gniadkowski, M.; Hayden, M. K.; Kumarasamy, K.; Livermore, D. M.; Maya, J. J.; Nordmann, P.; Patel, J. B. ; Paterson, D. L.; Pitout, J.; Villegas, M. V.; Wang, H.; Woodford, N.; Quinn, J. P. 2013. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 13(9):785-96.

7. Ezadi, F.; Ardebili, A.; Mirnejad, R. 2019. Antimicrobial Susceptibility Testing for Polymyxins: Challenges, Issues, and Recommendations. *J Clin Microbiol.* 57(4).

8. Biswas, S.; Brune, J.M.; Dubus, J.C.; Reynaud-Gaubert, M.; Rolain, J.M. 2012. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 10(8):917-34.

9. Esposito, E.P.; Cervoni, M.; Bernardo, M.; Crivaro, V.; Cuccurullo, S.; Imperi, F.; Zarrilli, R. 2018. Molecular Epidemiology and Virulence Profiles of Colistin-Resistant

Klebsiella pneumoniae Blood Isolates From the Hospital Agency "Ospedale dei Colli," Naples, Italy. *Front Microbiol.* 9:1463.

10. Cannatelli, A.; Giani, T.; D'Andrea, M. M.; Di Pilato, V.; Arena, F.; Conte, V.; Tryfinopoulou, K.; Vatopoulos, A.; Rossolini, G.M.; COLGRIT Study Group. 2014. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(10):5696-703.

11. Olaitan, A.O.; Morand, S.; Rolain, J. M. 2014. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 26;5:643.

12. Liu, Y. Y.; Wang, Y.; Walsh, T. R.; Yi, L. X.; Zhang, R.; Spencer, J.; Doi, Y.; Tian, G.; Dong, B.; Huang, X.; Yu, L. F.; Gu, D.; Ren, H.; Chen, X.; Lv, L.; He, D.; Zhou, H.; Liang, Z.; Liu, J. H.; Shen, J. 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(2):161-8.

13. Poirel, L.; Jayol, A.; Bontron, S.; Villegas, M. V.; Ozdamar, M.; Türkoglu, S.; Nordmann, P. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015. 70(1):75-80.

14. International Organization for Standardization. 2019. ISO 20776-1 - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Available at www.en-standard.eu/iso-20776-1-susceptibility-testing-of-infectious-agents-and-evaluation-of-performance-of-antimicrobial-susceptibility-test-devices-part-1-broth-micro-dilution-reference-method-for-testing-the-in-vitro-activity-of-antimicrobial-agents-against-rapidly-growi/

15. Zavascki, A.P.; Girardello, R.; Magagnin, C.M.; Antochévis, L.C.; Maciel, R.A.; Palmeiro, J.K.; Gales, A.C. 2018. Emergence of polymyxin B resistance in a polymyxin B-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* causing bloodstream infection in a neutropenic patient during polymyxin B therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 90(2):134-138.
16. Larsen, M. V.; Cosentino, S.; Rasmussen, S.; Friis, C.; Hasman, H.; Marvig, R. L.; Jelsbak, L.; Sicheritz-Pontén, T.; Ussery, D. W.; Aarestrup, F. M.; Lund, O. 2012. Multilocus Sequence Typing of Total Genome Sequenced Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 50(4): 1355-1361.
17. Zankari, E.; Hasman, H.; Cosentino, S.; Vestergaard, M.; Rasmussen, S.; Lund, O.; Aarestrup, F. M.; Larsen, M. V. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 67(11):2640-4.
18. Aires, C. A.; Pereira, P. S.; Asensi, M. D.; Carvalho-Assef, A. P. 2016. *mgrB* Mutations Mediating Polymyxin B Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Rectal Surveillance Swabs in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* Oct 21;60(11):6969-6972.
19. Lomonaco, S.; Crawford, M.A.; Lascols, C.; Timme, R.E.; Anderson, K.; Hodge, D.R.; Fisher, D.J.; Pillai, S.P.; Morse, S.A.; Khan, E.; Hughes, M.A.; Allard, M.W.; Sharma, S.K. 2018. Resistome of carbapenem- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS One.* 8;13(6):e0198526.
20. Pitt, M.E.; Elliott, A.G.; Cao, M.D.; Ganesamoorthy, D.; Karaiskos, I.; Giamarellou, H.; Abboud, C.S.; Blaskovich, M.A.T.; Cooper, M.A.; Coin, L.J.M. 2018. Multifactorial

chromosomal variants regulate polymyxin resistance in extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Genom.* 4(3).

21. Halaby, T.; Kucukkose, E.; Janssen, A.B.; Rogers, M.R.; Doorduijn, D.J.; van der Zanden, A.G.; Al Naiemi, N.; Vandenbroucke-Grauls, C.M.; van Schaik, W. Nov. 2016. Genomic Characterization of Colistin Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* during a Nosocomial Outbreak. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016. 21;60(11):6837-6843.

22. Shankar, C.; Mathur, P.; Venkatesan, M.; Pragasam, A. K.; Anandan, S.; Khurana, S.; Veeraraghavan, B. 2019. Rapidly disseminating blaOXA-232 carrying *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST231 in India: multiple and varied mobile genetic elements. *BMC Microbiol.* 19(1):137.

23. Giani, T.; Arena, F.; Vaggelli, G.; Conte, V.; Chiarelli, A.; Henrici De Angelis, L.; Fornaini, R.; Grazzini, M.; Niccolini, F.; Pecile, P.; Rossolini, G. M. 2015. Large Nosocomial Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Traced to Clonal Expansion of an mgrB Deletion Mutant. *J Clin Microbiol.* 53(10):3341-4.

24. Leung, L.M.; Cooper, V.S.; Rasko, D.A.; Guo, Q.; Pacey, M.P.; McElheny, C.L.; Mettus, R.T.; Yoon, S.H.; Goodlett, D.R.; Ernst, R.K.; Doi, Y. 2017. Structural modification of LPS in colistin-resistant, KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 72(11):3035-3042.

25. Bernasconi, O.J.; Donà, V.; Pires, J.; Kuenzli, E.; Hatz, C.; Luzzaro, F.; Perreten, V.; Endimiani, A. 2018. Deciphering the complete deletion of the mgrB locus in an unusual colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate colonising the gut of a traveller returning from India. *Int J Antimicrob Agents.* 51(3):529-531.

26. Macesic, N.; Nelson, B.; Mcconville, T. H.; Giddins, M. J.; Green, D. A.; Stump. S.; Gomez-Simmonds, A.; Annavajhala, M. K.; Uhlemann, A. C. 2020. Emergence of Polymyxin Resistance in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Through Diverse Genetic Adaptations: A Genomic, Retrospective Cohort Study. *Clin Infect Dis.* 70(10):2084-2091.
27. Peirano, G.; Bradford, P. A.; Kazmierczak, K. M.; Chen, L.; Kreiswirth, B. N.; Pitout, J. D. 2017. Importance of Clonal Complex 258 and IncFK2-like Plasmids among a Global Collection of *Klebsiella pneumoniae* with blaKPC. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(4). pii: e02610-16.
28. Xiaoliang, W.; Huiming, H.; Chunlei, C.; Beiwen, Z. 2019. Genomic characterisation of a colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11 strain co-producing KPC-2, FloR, CTX-M-55, SHV-12, FosA and RmtB causing a lethal infection. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019. 19:78-80.
29. Boszczowski, I.; Salomão, M. C.; Moura, M. L.; Freire, M. P.; Guimarães, T.; Cury, A. P.; Rossi, F.; Rizek, C. F.; Martins, R. C. R.; Costa, S. F. 2019. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: genetic diversity, mechanisms of resistance to polymyxins and clinical outcomes in a tertiary teaching hospital in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 19;61:e29.
30. Andrey, D.O.; Dantas, P.; Martins, W.B.S.; Marques de Carvalho, F.; Gonzaga, L.A.; Sands, K.; Portal, E.; Sauser, J.; Cayô, R.; Nicolas, M.F.; Vasconcelos, A.T.R.; Medeiros, E.A.; Walsh, T.R.; Gales, A.C. 2019. An Emerging Clone, KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST16, Associated with High Mortality Rates in a CC258 Endemic Setting. *Clin Infect Dis.* pii: ciz1095.

31. Andrade, L.N.; Curiao, T.; Ferreira, J.C.; Longo, J.M.; Clímaco, E.C.; Martinez, R.; Bellissimo-Rodrigues, F.; Basile-Filho, A.; Evaristo, M.A.; Del Peloso, P.F.; Ribeiro, V.B.; Barth, A.L.; Paula, M.C.; Baquero, F.; Cantón, R.; Darini, A.L.; Coque, T.M. 2011. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(7):3579-83.
32. Bassetti, M.; Righi, E.; Carnelutti, A.; Graziano, E.; Russo, A. 2018. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: challenges for treatment, prevention and infection control. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 16(10):749-761.
33. Haelli, M.; Javani, A.; Moradi, J.; Jafari, Z.; Feizabadi, M.M.; Babaei, E. 2017. MgrB Alterations Mediate Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Iran. *Front Microbiol.* 18;8:2470.
34. Yang, Y.Q.; Li, Y.X.; Lei, C.W.; Zhang, A.Y.; Wang, H.N. 2018. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 73(7):1791-1795.
35. Rodrigues, A. C. S.; Santos, I. C. O.; Campos, C. C.; Rezende, I. N.; Ferreira, Y. M.; Chaves, C. E. V.; Rocha-de-Souza, C. M.; Carvalho-Assef, A. P. D.; Chang, M. R. 2019. Non-clonal occurrence of pmrB mutations associated with polymyxin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 114:e180555.

Table 1 – Characterization of *mgrB* mutated isolates.

Isolate	Polymyxin B MIC	Hospital	Source	Date	<i>mgrB</i> alteration	IS Accession Number	ST	Carbapenemase	Other Resistance Genes
966	32	H1	Urine	September, 2013	IS5	STN20241.1	ST 437	KPC	<i>aac(3)-Ild, aac(6')-Ib-cr, aph(3')-Ia, tet(A), tet(D), bla_{CTXM-15}, bla_{KPC-2}, bla_{OXA-1}, bla_{SHV-182}, bla_{TEM-1B}</i>
1175	32	H2	Ascites fluid	October, 2013	IS5	WP_110521969.1	ST 437	KPC	<i>aac(3)-Ild, aac(6')-Ib-cr, aph(3'')-Ib, aph(3')-Ia, aph(6)-Ild, tet(A), tet(D), bla_{CTXM-14}, bla_{CTXM-15}, bla_{KPC-2}, bla_{OXA-1}, bla_{SHV-182}, bla_{TEM-1B}</i>
1188	32	H2	Urine	October, 2013	IS5	WP_077271668.1	ST 437	KPC	<i>aac(3)-Ild, aac(6')-Ib-cr, aph(3')-Ia, aac(6')-Ib3, tet(A), tet(D), bla_{CTXM-15}, bla_{KPC-2}, bla_{OXA-1}, bla_{SHV-182}, bla_{TEM-1B}</i>
2200	32	H1	Urine	February, 2014	ISKpn26	WP_165590220.1	ST 437	KPC	<i>aac(3)-Ild, aac(6')-Ib-cr, aph(3')-Ia, aac(3)-Ild, aac(6')-Ib-cr, aph(3')-Ia, tet(D), bla_{CTXM-15}, bla_{KPC-2}, bla_{OXA-1}, bla_{SHV-182}, bla_{TEM-1B}</i>
3800	64	H2	Blood	October, 2014	IS5	WP_016151349.1	ST 437	KPC	<i>aac(3)-Ild, aac(6')-Ib-cr, aph(3')-Ia, tet(A), tet(D), bla_{CTXM-15}, bla_{KPC-2}, bla_{OXA-1}, bla_{SHV-182}, bla_{TEM-1B}</i>
3854	32	H1	Dialysis fluid	November, 2014	IS1	STJ16063.1	ST 437	KPC	<i>aac(3)-Ild, aac(6')-Ib-cr, aph(3')-Ia, tet(A), tet(D), bla_{CTXM-15}, bla_{KPC-2}, bla_{OXA-1}, bla_{SHV-182}, bla_{TEM-1B}</i>
3865	16	H3	Rectal swab	November, 2014	IS3	WP_119589562.1	ST 11	KPC	<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib3, aadA1, bla_{KPC-2}, bla_{OXA-2}, bla_{SHV-182}, bla_{TEM-1A}</i>
3922	16	H3	Blood	November, 2014	ISKpn13	WP_113975976.1	ST 11	KPC	<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib3, bla_{KPC-2}, bla_{OXA-2}, bla_{SHV-182}, bla_{TEM-1B}</i>
4110	32	H3	Rectal swab	December, 2014	ISKpn13	WP_163583967.1	ST 16	KPC	<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib3, aadA2, bla_{CTX-M-2}, bla_{KPC-2}, bla_{OXA-2}, bla_{SHV}, bla_{TEM-1B}</i>
4447	16	H3	Blood	February, 2015	IS5	WP_167876443.1	ST 340	KPC	<i>aac(6')-Ib3, aadA2, tet(D), bla_{CTX-M-2}, bla_{KPC-2}, bla_{SHV-182}, bla_{TEM-1B}</i>
4449	32	H3	Blood	February, 2015	ISKpn13	WP_113975976.1	ST 11	KPC	<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib-cr, aph(3')-Ia, tet(A), bla_{CTXM-15}, bla_{KPC-2}, bla_{OXA-1}, bla_{OXA-2}, bla_{SHV-182}, bla_{TEM-1B}</i>
3742	32	H2	Urine	October, 2014	Deletion	-	ST 11	NDM	<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib, aadA1, bla_{CTXM-6}, bla_{NDM-1}, bla_{OXA-9}, bla_{SCO-1}, bla_{SHV-182}, bla_{TEM-1B}, bla_{TEM-79}</i>

Table 2 – Genotype evaluation on canonical genes.

Gene	Isolate	Nucleotide Position	Nucleotide	Substitute nucleotide	Amino acid Mutation
<i>pmrA</i>	4110	193	C	T	R64R
	4110	503	T	C	E167G
<i>pmrB</i>	4110	253	C	T	A84A
	4110	333	C	G	G110R
	4110	436	C	G	P145P
	966	492	A	G	S163P
	4110	700	C	T	L233L
	3742	900	C	A	V299F
<i>pmrD</i>	4110	78	G	A	L25L
<i>phoQ</i>	4110	445	G	A	I148I
	4110	904	G	A	S301S
	4110	1249	G	A	D416D

5. DISCUSSÃO

Apesar da toxicidade preocupante e bem reconhecida das polimixinas, elas continuam a ser usadas como drogas de última linha para o tratamento da CRE. No entanto, a resistência à polimixina tem sido descrita em todo o mundo e agrava ainda mais a situação (Olaitan et al., 2014).

Alteração no gene *mgrB* é o mecanismo mais frequentemente relatado causando resistência à polimixina em *Klebsiella pneumoniae*, e a alteração mais frequente é a inserção de diferentes tipos de elementos móveis, como as sequências de inserção (IS) (Cannatelli et al., 2014; Macesic et al., 2019). Em nosso estudo, o *mgrB* de 31,4% dos isolados resistentes à polimixina B eram interrompidos pela inserção de IS.

Diversas IS já foram relatadas no *mgrB* de *K. pneumoniae*, no entanto, IS5 é a sequência mais frequentemente relatada no Brasil e no mundo (Cannatelli et al., 2014; Aires et al., 2016; Lomonaco et al., 2018), o que também observamos no nosso : 45,5% e em um período mais longo de tempo – 17 meses – e em todos os hospitais, demonstrando a sua estabilidade como sequência de inserção e capacidade de disseminação. ISKpn13 foi a segunda IS mais frequente em nosso estudo, sendo identificada em três isolados (27,3%). A sequência já havia sido relatada por Pitt e colaboradores (2018) em um estudo com amostras provenientes do Brasil, demonstrando que a sequência já havia sido encontrada no país (Pitt et al., 2018). A sequência IS1 foi identificada em apenas um isolado em nosso estudo (9,1%) e já havia sido relatada inserida no *mgrB* de *K. pneumoniae* no sul do Brasil no ano de 2018 (Zavascki et al., 2018). ISKpn26 também foi relatada em apenas um isolado em nosso estudo, demonstrando sua baixa prevalência, entretanto, já havia sido reportada no Brasil (Pitt et al., 2018). Da mesma forma, a sequência IS3 foi identificada em apenas um isolado, e embora já tenha sido relatada em Amsterdam (Halaby et al., 2016), este é o primeiro relato de IS3 inserida em *mgrB* em isolados de *K. pneumoniae* no Brasil.

Um isolado não apresentou amplificação no gene *mgrB*, sendo esse resultado posteriormente confirmado no NGS visto que não foi possível identificar esse gene a partir da análise in silico de todo o genoma. De fato, há relatos em que a resistência pode estar associada a deleção total do gene *mgrB* com consequente não regulação dos sistemas de dois componentes e alteração

no LPS, impedindo a ligação da polimixina (Cannatelli *et al.* 2013; Giani *et al.*, 2015; Leung *et al.*, 2017; Bernasconi *et al.*, 2018; Macesic *et al.*, 2019).

Além disso, mutações pontuais *nonsense*, *missense*, deleções (pequenas ou grandes) em genes relacionados com o sistema de dois componentes regulado pelo *mgrB* (*pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ*) podem estar associadas a resistência à polimixina em isolados de *K. pneumoniae*. Em nosso estudo, encontramos mutações ainda não descritas anteriormente em 25% dos isolados, sendo elas: *pmrA* – missense mutation no isolado 4110 (E167G) e mutação silenciosa no isolado 4110 (R64R); *pmrB* – mutação *missense* no isolado 966 (S163P) e isolado 3742 (V299F), mutações *missense* e silenciosa no isolado 4110 (A84A, G110R, P145P, L233L); *pmrD* – mutação silenciosa no isolado 4110 (L25L); e *phoQ* – mutação silenciosa no isolado 4110 (I148I, S301S, D416D). Embora algumas mutações associadas ao gene *pmrB* sejam frequentemente encontradas no Brasil (R256G e T246A) (Aires *et al.*, 2016), elas não foram encontradas em nossos isolados.

A capacidade de disseminação do isolado está intimamente ligada a Sequence Type (ST) do mesmo. A ST encontrada com maior incidência em nosso estudo foi a ST437, encontrada em 6 isolados (50%). ST11, assim como a ST340 fazem parte do CC258 (Peirano *et al.*, 2017), e foram encontradas, respectivamente, em quatro (33,3%) e um isolado (9,1%).

A ST16, recentemente relatada por Andrey e colaboradores (2019), foi encontrada em apenas um isolado, e assim como no relato de Andrey em que é descrito um clone de alto risco, o isolado presente em nosso estudo também parece ser. Levando em consideração que a mutação de genes alvos envolvido na resistência das cepas (*pmrA*, *pmrB*, *pmrD* e *phoQ*) confere adaptação e perpetuação das espécies, esse isolado se mostrou o mais mutado dentre todos os isolados do estudo, corroborando para a possibilidade de ser um isolado de alto risco.

Diversas STs já foram descritas em isolados com *mgrB* deletado, como ST512 e ST2261, sendo a maior parte delas associada à ST258. (Cannatelli *et al.* 2013; Giani *et al.*, 2015; Leung *et al.*, 2017; Bernasconi *et al.*, 2018). Em nosso trabalho, o isolado com *mgrB* deletado faz parte da ST11, fazendo parte do CC258 (Peirano *et al.*, 2017).

A disseminação clonal de isolados bacterianos resistentes a antibióticos é uma preocupação no ambiente hospitalar (Andrey *et al.*, 2019; Andrade *et al.*, 2011). Analisando os resultados do nosso estudo, é possível considerar a disseminação de um clone no hospital 2, visto que os três isolados obtidos no hospital pertencem à mesma ST437 e apresentavam a mesma IS5. Além disso, a questão temporal pode reforçar a hipótese, pois dois dos três isolados foram obtidos no mesmo mês de 2013. Outra possibilidade de disseminação clonal pode ser considerada no Hospital 3, visto que dois isolados pertencem à mesma ST11, possuem o *mgrB* mutado pela mesma ISKpn13 e foram obtidos em um período de 3 meses.

Levando em consideração todos os dados encontrados no estudo, alguns achados corroboraram ao que já está descrito na literatura, contudo a inserção da sequência IS3 é inédita em isolados brasileiros. Ainda, mutação nos genes canônicos que também levam ao desenvolvimento de resistência de polimixina foram identificadas pela primeira vez, como mutações missense (E167G) no gene *pmrA*, mutações missense e no gene *pmrB* (S163P, V299F, G110R), dentre outras mutações que não levam a alteração em aminoácidos.

Sabendo que a resistência a polimixina é um sistema complexo, e tendo ainda diversos isolados que apresentam o gene *mgrB* intacto, mas com MIC superior a 32 µg/mL, um possível estudo futuro seria avaliar por NGS esses isolados para conseguir determinar outros determinantes de resistência.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AbuOun, M.; Stubberfield, E.J.; Duggett, N.A.; Kirchner, M.; Dormer, L.; Nunez-Garcia, J.; Randall, L.P.; Lemma, F.; Crook, D.W.; Teale, C.; Smith, R.P.; Anjum, M.F. *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. **J Antimicrob Chemother.** 2018. 73(10):2904. doi: 10.1093/jac/dky272.

Adeolu, M.; Alnajar, S.; Naushad, S. S.; Gupta, R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov.. **Int J Syst Evol Microbiol.** 2016. 66(12):5575-5599. doi: 10.1099/ijsem.0.001485.

Aires, C. A.; Pereira, P. S.; Asensi, M. D.; Carvalho-Assef, A. P. *mgrB* Mutations Mediating Polymyxin B Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Rectal Surveillance Swabs in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** 2016. Oct 21;60(11):6969-6972. doi: 10.1128/AAC.01456-16.

Allen, H.K.; Donato, J.; Wang, H. H.; Cloud-Hansen K.A.; Davies, J.; Handelsman, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nat Rev Microbiol.** 2010. 8(4):251-9. doi: 10.1038/nrmicro2312.

Andrade, L.N.; Curiao, T.; Ferreira, J.C.; Longo, J.M.; Clímaco, E.C.; Martinez, R.; Bellissimo-Rodrigues, F.; Basile-Filho, A.; Evaristo, M.A.; Del Peloso, P.F.; Ribeiro, V.B.; Barth, A.L.; Paula, M.C.; Baquero, F.; Cantón, R.; Darini, A.L.; Coque, T.M. Dissemination of *bla*KPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (*IncFII*, *IncN*, *IncL/M*) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** 2011. 55(7):3579-83. doi: 10.1128/AAC.01783-10.

Andrey, D.O.; Dantas, P.; Martins, W.B.S.; Marques de Carvalho, F.; Gonzaga, L.A.; Sands, K.; Portal, E.; Sauser, J.; Cayô, R.; Nicolas, M.F.; Vasconcelos, A.T.R.; Medeiros, E.A.; Walsh, T.R.; Gales, A.C. An Emerging Clone, KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST16, Associated with High Mortality Rates in a CC258 Endemic Setting. **Clin Infect Dis.** 2019. pii: ciz1095. doi: 10.1093/cid/ciz1095.

Bernasconi, O.J.; Donà, V.; Pires, J.; Kuenzli, E.; Hatz, C.; Luzzaro, F.; Perreten, V.; Endimiani, A. Deciphering the complete deletion of the *mgrB* locus in an unusual colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate colonising the gut of a traveller returning from India. **Int J Antimicrob Agents.** 2018. 51(3):529-531. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.09.014.

Biswas, S.; Brunel, J.M.; Dubus, J.C.; Reynaud-Gaubert, M.; Rolain, J.M. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. **Expert Rev Anti Infect Ther.** 2012. 10(8):917-34. doi: 10.1586/eri.12.78.

Breilh, D.; Texier-Maugein, J.; Allaouchiche, B.; Saux, M.C.; Boselli, E. Carbapenems. **J Chemother.** 2013. Feb;25(1):1-17. doi: 10.1179/1973947812Y.0000000032.

Boszczowski, I.; Salomão, M. C.; Moura, M. L.; Freire, M. P.; Guimarães, T.; Cury, A. P.; Rossi, F.; Rizek, C. F.; Martins, R. C. R.; Costa, S. F. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: genetic diversity, mechanisms of resistance to polymyxins and clinical outcomes in a tertiary teaching hospital in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 2019. 61:e29. doi: 10.1590/S1678-9946201961029.

Campos, M. A.; Vargas, M. A.; Rigueiro, V.; Llompарт, C. M.; Alberti, S.; Bengoechea, J. A. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Infect. Immun.** 2004. 72(12):7107-14.

Cannatelli, A.; D'Andrea, M.M.; Giani, T.; Di Pilato, V.; Arena, F.; Ambretti, S.; Gaibani, P.; Rossolini, G.M. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. **Antimicrob Agents Chemother.** 2013. 57(11):5521-6. doi: 10.1128/AAC.01480-13.

Cannatelli, A.; Giani, T.; D'Andrea, M. M.; Di Pilato, V.; Arena, F.; Conte, V.; Tryfinopoulou, K.; Vatopoulos, A.; Rossolini, G.M.; COLGRIT Study Group. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. **Antimicrob Agents Chemother.** 2014. 58(10):5696-703. doi: 10.1128/AAC.03110-14.

Capone, A.; Giannella, M.; Fortini, D.; Giordano, A.; Meledandri, M.; Ballardini, M.; Venditti, M.; Bordi, E.; Capozzi, D.; Balice, M. P.; Tarasi, A.; Parisi, G.; Lappa, A.; Carattoli, A.; Petrosillo, N. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. **Clin Microbiol Infect.** 2013. 19(1):E23-E30. doi: 10.1111/1469-0691.12070.

Carattoli, A.; Villa, L.; Feudi, C.; Curcio, L.; Orsini, S.; Luppi, A.; Pezzotti, G.; Magistrali, C. F. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. **Euro Surveill.** 2017. 3;22(31). pii: 30589. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589.

Doi, Y.; Wachino, J.I.; Arakawa, Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. **Infect Dis Clin North Am.** 2016. 30(2):523-537. doi: 10.1016/j.idc.2016.02.011.

Dong, N.; Yang, X.; Zhang, R.; Chan, E. W.; Chen, S. Tracking microevolution events among ST11 carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* outbreak strains. **Emerg Microbes Infect.** 2018. 7(1):146. doi: 10.1038/s41426-018-0146-6.

Ellem, J. A.; Ginn, A. N.; Chen, S. C.; Ferguson, J.; Partridge, S. R.; Iredell, J. R. Locally Acquired mcr-1 in *Escherichia coli*, Australia, 2011 and 2013. **Emerg Infect Dis**. 2017. 23(7):1160-1163. doi: 10.3201/eid2307.161638.

Esposito, E.P.; Cervoni, M.; Bernardo, M.; Crivaro, V.; Cuccurullo, S.; Imperi, F.; Zarrilli, R. Molecular Epidemiology and Virulence Profiles of Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Blood Isolates From the Hospital Agency "Ospedale dei Colli," Naples, Italy. **Front Microbiol**. 2018. 9:1463. doi: 10.3389/fmicb.2018.01463.

European Centre for Disease Prevention and Control. Point Prevalence Survey of Healthcare associated Infections and Antimicrobial Use in European Acute Care Hospitals. Stockholm: ECDC; 2013. Available from: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/healthcare-associated-infectionsantimicrobial-use-PPS.pdf>. Accessed January 2020.

Evans, M.E.; Feola, D.J.; Rapp, R.P. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. **Ann. Pharmacother**. 1999. 33(9):960-7.

Ezadi, F.; Ardebili, A.; Mirnejad, R. Antimicrobial Susceptibility Testing for Polymyxins: Challenges, Issues, and Recommendations. **J Clin Microbiol**. 2019. 57(4). pii: e01390-18. doi: 10.1128/JCM.01390-18.

França, L.T.; Carrilho, E.; Kist, T.B. A review of DNA sequencing techniques. **Q Rev Biophys**. 2002. 35(2):169-200.

Gao, R.; Hu, Y.; Li, Z.; Sun, J.; Wang, Q.; Lin, J.; Ye, H.; Liu, F.; Srinivas, S.; Li, D.; Zhu, B.; Liu, Y. H.; Tian, G. B.; Feng, Y. Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance. **PLoS Pathog**. 2016. 2(11):e1005957. doi: 10.1371/journal.ppat.1005957.

Giani, T.; Arena, F.; Vaggelli, G.; Conte, V.; Chiarelli, A.; Henrici De Angelis, L.; Fornaini, R.; Grazzini, M.; Niccolini, F.; Pecile, P.; Rossolini, G. M. Large Nosocomial Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Traced to Clonal Expansion of an mgrB Deletion Mutant. **J Clin Microbiol**. 2015. 53(10):3341-4. doi: 10.1128/JCM.01017-15.

Haeili, M.; Javani, A.; Moradi, J.; Jafari, Z.; Feizabadi, M.M.; Babaei, E. MgrB Alterations Mediate Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Iran. **Front Microbiol**. 2017. 8:2470. doi: 10.3389/fmicb.2017.02470.

Halaby, T.; Kucukkose, E.; Janssen, A.B.; Rogers, M.R.; Doorduyn, D.J.; van der Zanden, A.G.; Al Naiemi, N.; Vandenbroucke-Grauls, C.M.; van Schaik, W. Nov. Genomic Characterization of Colistin Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* during a Nosocomial Outbreak. **Antimicrob Agents Chemother**. 2016. 60(11):6837-6843. doi: 10.1128/AAC.01344-16.

Hasman, H.; Hammerum, A. M.; Hansen, F.; Hendriksen, R. S.; Olesen, B.; Agersø, Y.; Zankari, E.; Leekitcharoenphon, P.; Stegger, M.; Kaas, R. S.;

Cavaco, L. M.; Hansen, D. S.; Aarestrup, F. M.; Skov, R. L. Detection of mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark. **Eurosurveillance**. 2015. 20(49). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.49.30085.

Helander I.M.; Kato, Y.; Kilpelainen, I.; Kostianen, R.; Lindner, B.; Nummila, K.; Sugiyama, T.; Yokochi, T. Characterization of lipopolysaccharides of polymyxin-resistant and polymyxin-sensitive *Klebsiella pneumoniae* O3. **Eur. J. Biochem**. 1996. 237(1):272-8.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 20776-1:2006. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1 - Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobials agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland, 2006.

Irrgang, A.; Roschanski, N.; Tenhagen, B.A.; Grobbel, M.; Skladnikiewicz-Ziemer, T.; Thomas, K.; Roesler, U.; Käsbohrer, A. Prevalence of mcr-1 in *E. coli* from livestock and food in Germany, 2010–2015. **PlosOne**. 2016. 11(7):e0159863. doi: 10.1371/journal.pone.0159863.

Karaiskos, I.; Lagou, S.; Pontikis, K.; Rapti, V.; Poulakou, G. The "Old" and the "New" Antibiotics for MDR Gram-Negative Pathogens: For Whom, When, and How. **Front Public Health**. 2019. 7:151. doi: 10.3389/fpubh.2019.00151.

Larsen, M. V.; Cosentino, S.; Rasmussen, S.; Friis, C.; Hasman, H.; Marvig, R. L.; Jelsbak, L.; Sicheritz-Pontén, T.; Ussery, D. W.; Aarestrup, F. M.; Lund, O. Multilocus Sequence Typing of Total Genome Sequenced Bacteria. **J. Clin. Microbiol**. 2012. 50(4): 1355-1361. doi: 10.12.0/JCM.06094-11

Leung, L.M.; Cooper, V.S.; Rasko, D.A.; Guo, Q.; Pacey, M.P.; McElheny, C.L.; Mettus, R.T.; Yoon, S.H.; Goodlett, D.R.; Ernst, R.K.; Doi, Y. Structural modification of LPS in colistin-resistant, KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother**. 2017. 72(11):3035-3042. doi: 10.1093/jac/dkx234.

Li, X.P.; Sun, R.Y.; Song, J.Q.; Fang, L.X.; Zhang, R.M.; Lian, X.L.; Liao, X.P.; Liu, Y.H.; Lin, J.; Sun, J. Within-host heterogeneity and flexibility of mcr-1 transmission in chicken gut. **Int J Antimicrob Agents**. 2020. 55(1):105806. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.09.010.

Lippa, A.M.; Goulian, M. Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. **PLoS Genet**. 2009. 5(12):e1000788. doi: 10.1371/journal.pgen.1000788.

Liu, Y. Y.; Wang, Y.; Walsh, T. R.; Yi, L. X.; Zhang, R.; Spencer, J.; Doi, Y.; Tian, G.; Dong, B.; Huang, X.; Yu, L. F.; Gu, D.; Ren, H.; Chen, X.; Lv, L.; He, D.; Zhou, H.; Liang, Z.; Liu, J. H.; Shen, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a

microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**. 2015. 16(2):161-8. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.

Liu, Y. Y.; Chandler, C. E.; Leung, L. M.; McElheny, C. L.; Mettus, R. T., Shanks, R. M. Q.; Liu, J. H.; Goodlett, D. R.; Ernst, R. K.; Doi, Y. Structural Modification of Lipopolysaccharide Conferred by *mcr-1* in Gram-Negative ESKAPE Pathogens. **Antimicrob Agents Chemother**. 2017. 61(6). pii: e00580-17. doi: 10.1128/AAC.00580-17.

Lomonaco, S.; Crawford, M.A.; Lascols, C.; Timme, R.E.; Anderson, K.; Hodge, D.R.; Fisher, D.J.; Pillai, S.P.; Morse, S.A.; Khan, E.; Hughes, M.A.; Allard, M.W.; Sharma, S.K. Resistome of carbapenem- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **PLoS One**. 2018. 13(6):e0198526. doi: 10.1371/journal.pone.0198526.

Macesic, N.; Nelson, B.; Mcconville, T. H.; Giddins, M. J.; Green, D. A.; Stump. S.; Gomez-Simmonds, A.; Annavajhala, M. K.; Uhlemann, A. C. Emergence of Polymyxin Resistance in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Through Diverse Genetic Adaptations: A Genomic, Retrospective Cohort Study. **Clin Infect Dis**. 2020. 70(10):2084-2091. doi: 10.1093/cid/ciz623.

Maiden, M.C.; Bygraves, J.A.; Feil, E.; Morelli, G.; Russell, J.E.; Urwin, R.; Zhang, Q.; Zhou, J.; Zurth, K.; Caugant, D.A.; Feavers, I.M.; Achtman, M.; Spratt, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 1998. 95(6):3140-5.

Munoz-Price, L. S.; Poirel, L. Bonomo, R. A.; Schwaber, M. J., Daikos, G. L.; Cormican, M.; Cornaglia, G.; Garau, J.; Gniadkowski, M.; Hayden, M. K.; Kumarasamy, K.; Livermore, D. M.; Maya, J. J.; Nordmann, P.; Patel, J. B. ; Paterson, D. L.; Pitout, J.; Villegas, M. V.; Wang, H.; Woodford, N.; Quinn, J. P. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infect Dis**. 2013. 13(9):785-96. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70190-7.

Olaitan, A.O.; Morand, S.; Rolain, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Front Microbiol**. 2014. 5:643. doi: 10.3389/fmicb.2014.00643.

Padilla, E.; Llobet, E.; Domenech-Sanchez, A.; Martinez-Martinez, L.; Bengoechea, J. A.; Alberti, S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrob. Agents Chemother**. 2010. 54(1):177-83. doi: 10.1128/AAC.00715-09.

Pareek, C. S.; Smoczynski, R.; Tretyn, A. Sequencing technologies and genome sequencing. **J Appl Genet**. 2011. 52(4):413-35. doi: 10.1007/s13353-011-0057-x.

Partridge, S. R. Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. **Pathology**. 2015. 47(3):276-84. doi: 10.1097/PAT.0000000000000237.

Peri, A. M.; Doi, Y.; Potoski, B. A.; Harris, P. N. A.; Paterson, D. L.; Righi, E. Antimicrobial treatment challenges in the era of carbapenem resistance. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2019. 94(4):413-425. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.01.020.

Pitt, M.E.; Elliott, A.G.; Cao, M.D.; Ganesamoorthy, D.; Karaikos, I.; Giamarellou, H.; Abboud, C.S.; Blaskovich, M.A.T.; Cooper, M.A.; Coin, L.J.M. Multifactorial chromosomal variants regulate polymyxin resistance in extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Microb Genom.** 2018. 4(3). doi: 10.1099/mgen.0.000158.

Prim, N.; Rivera, A.; Rodríguez-Navarro, J.; Español, M.; Turbau, M.; Coll, P.; Mirelis, B. Detection of *mcr-1* colistin resistance gene in polyclonal *Escherichia coli* isolates in Barcelona, Spain, 2012 to 2015. **Eurosurveillance.** 2016. 21(13). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.13.30183.

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

Ramirez, M.S.; Tolmasky, M.E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resist Updat.** 2010. 13(6):151-71. doi: 10.1016/j.drug.2010.08.003.

Robicsek, A.; Jacoby, G.A.; Hooper, D.C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. **Lancet Infect Dis.** 2006. 6(10):629-40.

Rodrigues, A. C. S.; Santos, I. C. O.; Campos, C. C.; Rezende, I. N.; Ferreira, Y. M.; Chaves, C. E. V.; Rocha-de-Souza, C. M.; Carvalho-Assef, A. P. D.; Chang, M. R. Non-clonal occurrence of *pmrB* mutations associated with polymyxin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2019. 114:e180555. doi: 10.1590/0074-02760180555.

Serio, A.W.; Keepers, T.; Andrews, L.; Krause, K.M. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. **EcoSal Plus.** 2018. 8(1). doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2018.

Schleinitz, K.M.; Vallaey, T.; Kleinstaub, S. Structural characterization of ISCR8, ISCR22, and ISCR23, subgroups of IS91-like insertion elements. **Antimicrob Agents Chemother.** 2010. 54(10):4321-8. doi: 10.1128/AAC.00006-10.

Shankar, C.; Mathur, P.; Venkatesan, M.; Pragasam, A. K.; Anandan, S.; Khurana, S.; Veeraraghavan, B. Rapidly disseminating blaOXA-232 carrying *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST231 in India: multiple and varied mobile genetic elements. **BMC Microbiol.** 2019. 19(1):137. doi: 10.1186/s12866-019-1513-8.

Urwin, R.; Maiden, M. C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends Microbiol.** 2003. 11(10):479-87.

- Uz Zaman, T.; Abladi, M.; Siddique, M. I.; Aljohani, S. M.; Balkhy, H. H. Insertion element mediated *mgrB* disruption and presence of ISKpn28 in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Saudi Arabia. **Infect Drug Resist.** 2018. 11:1183-1187. doi: 10.2147/IDR.S161146.
- Yang, Y.Q.; Li, Y.X.; Lei, C.W.; Zhang, A.Y.; Wang, H.N. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother.** 2018. 73(7):1791-1795. doi: 10.1093/jac/dky111.
- Ye, H.; Li, Y.; Li, Z.; Gao, R.; Zhang, H.; Wen, R.; Gao, G. F.; Hu, Q.; Feng, Y. Diversified *mcr-1*-harbouring plasmid reservoirs confer resistance to colistin in human gut microbiota. **MBio.** 2016. 7(2):e00177. doi: 10.1128/mBio.00177-16.
- Yin, W.; Li, H., Shen, Y.; Liu, Z.; Wang, S.; Shen, Z.; Zhang, R.; Walsh, T.R.; Shen, J.; Wang, Y. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. **MBio.** 2017. 8(3). pii: e00543-17. doi: 10.1128/mBio.00543-17.
- Wang, X.; Wang, Y.; Zhou, Y.; Li, J.; Yin, W.; Wang, S.; Zhang, S.; Shen, J.; Shen, Z.; Wang, Y. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Emerg Microbes Infect.** 2018. 7(1):122. doi: 10.1038/s41426-018-0124-z.
- Xavier, B. B.; Lammens, C.; Ruhai, R.; Kumar-Singh, S.; Butaye, P.; Goossens, H.; Malhotra-Kumar, S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. **Eurosurveillance.** 2016. 21(27). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280.
- Xiaoliang, W.; Huiming, H.; Chunlei, C.; Beiwen, Z. Genomic characterisation of a colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11 strain co-producing KPC-2, FloR, CTX-M-55, SHV-12, FosA and RmtB causing a lethal infection. **J Glob Antimicrob Resist.** 2019. 19:78-80. doi: 10.1016/j.jgar.2019.08.023.
- Zankari, E.; Hasman, H.; Cosentino, S.; Vestergaard, M.; Rasmussen, S.; Lund, O.; Aarestrup, F. M.; Larsen, M. V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **J Antimicrob Chemother.** 2012. doi: 10.1093/jac/dks261.
- Zavascki, A.P.; Girardello, R.; Magagnin, C.M.; Antochévis, L.C.; Maciel, R.A.; Palmeiro, J.K.; Gales, A.C.; Emergence of polymyxin B resistance in a polymyxin B-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* causing bloodstream infection in a neutropenic patient during polymyxin B therapy. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2018. 90(2):134-138. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.10.006.
- Zhang, H.; Zhao, D.; Shi, Q.; Quan, J.; Li, X.; Yu, Y. The *mcr-1* Gene Has No Effect on Colistin Resistance When It Coexists with Inactivated *mgrB* Gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Microb Drug Resist.** 2018. 24(8):1117-1120. doi: 10.1089/mdr.2017.0291.