



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Marlon do Valle Barroso

Caracterização fenotípica e genotípica de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC: Investigação da associação entre colonização e infecção

São José do Rio Preto
2024

MARLON DO VALLE BARROSO

Caracterização fenotípica e genotípica de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC: Investigação da associação entre colonização e infecção

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Casella

São José do Rio Preto
2024

Caracterização fenotípica e genotípica de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC:
Investigação da associação entre colonização e infecção.

Barroso, Marlon do Valle

Caracterização fenotípica e genotípica de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC: Investigação da associação entre colonização e infecção.

Marlon do Valle Barroso
São José do Rio Preto, 2024.
121 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Tiago Casella

1. Infecções nosocomiais; 2. *K. pneumoniae* produtora de KPC; 3. colonização e infecção; 4. Pangenoma

MARLON DO VALLE BARROSO

Caracterização fenotípica e genotípica de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC: Investigação da associação entre colonização e infecção.

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Tiago Casella

2º Examinador:

3º Examinador

4º Examinador:

5º Examinador

Suplente:

Suplente

São José do Rio Preto, 19 de abril de 2024

Sumário

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	20
2.2 <i>Carbapenemases: uma ameaça à terapia antimicrobiana</i>	21
2.3 Principais linhagens associadas a infecções	23
2.4 <i>Fatores de risco e progressão da infecção</i>	24
2.5 Estrutura populacional e determinantes genéticos associados à patogenicidade	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 População-alvo e isolados de estudo	28
3.2 Identificação e suscetibilidade aos antimicrobianos por método automatizado	29
3.3 Extração de DNA e detecção de carbapenemase do tipo KPC	29
3.4 Tipagem molecular por restrição genômica com endonuclease	30
3.4.1 Preparação dos blocos de agarose	30
3.4.2 Digestão por endonuclease <i>Xba</i> I e eletroforese	31
3.5 Definição dos grupos dos isolados que somente colonizam e os que colonizam e também causam infecção	32
3.6 Análise de prontuários eletrônicos dos pacientes	33
3.7 Teste de suscetibilidade aos antibióticos por método de disco-difusão em água	33
3.8 Produção de biofilme e fenótipo de hiper mucoviscosidade	34
3.9 Sequenciamento do genoma e análises de bioinformática	35
3.9.1 Limpeza, montagem e anotação do genoma	36
3.9.2 Tipagem por MLST, K-type e O-type	36
3.9.3 Resistoma, plasmidoma, mobiloma, viruloma e patogenicidade	37
3.9.4 Análise de pangenoma	37
3.10 Ensaio de virulência em <i>Galleria mellonella</i>	38

4	Resultados e discussão	40
4.1	Características dos pacientes e respectivos isolados Kp-KPC.....	40
4.2	Perfil de suscetibilidade dos isolados de Kp-KPC obtidos de sítios de infecção	42
4.3	Tipagem molecular e seleção dos isolados de Kp-KPC pertencentes aos grupos ONLYCOL e COLINFEC.....	43
4.4	Dados clínicos e demográficos dos pacientes	45
4.5	Fenótipos de resistência e virulência.....	48
4.6	Análise genética a partir do sequenciamento do genoma	51
5	CONCLUSÃO	79
6	REFERÊNCIAS	81
7	APÊNDICES	95
7.1	APÊNDICE A – Dendrograma construído de acordo com a tipagem por <i>Xba</i> I- PFGE e as características genéticas dos 374 Kp-KPC	95
7.2	Apêndice B – Dados clínicos e demográficos dos pacientes.....	98
7.3	Apêndice C – Uso de dispositivos invasivo	100
7.4	Apêndice D - Exames laboratoriais dos pacientes.....	101
7.5	Apêndice E - Parâmetros de qualidade da montagem do genoma	103
7.6	Apêndice F - Anotações gênicas que contrastaram entre os grupos	105
7.7	Apêndice G - Sobrevivência em modelo de infecção em larvas de <i>G.</i> <i>mellonella</i> após o desafio com representantes do grupo COLINFEC.....	106
7.8	Apêndice H - Sobrevivência em modelo de infecção em larvas de <i>G.</i> <i>mellonella</i> após o desafio com representantes do grupo ONLYCOL.....	106
8	Anexos.....	107

Dedico este trabalho a todas as pessoas que perderam suas vidas em decorrência de infecções hospitalares. Que este estudo possa trazer luz à saúde e à segurança dos pacientes em ambientes hospitalares.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, pela oportunidade de realização do curso, e à agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa. Agradeço, também, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos recursos indiretamente destinados à pesquisa.

Agradeço à minha mãe, Elaine, ao meu irmão, Weider, ao meu tio, Luciano, e ao meu pai, Silvano por serem meus pilares e terem me proporcionado os melhores ensinamentos da vida. À Ranaíla, minha esposa, que, com sua paciência, motivação, afeto e amor, soube compreender os momentos de distância e dificuldade. Não poderia deixar de mencionar minha sogra, Leila e minha cunhada, Reilia, cujo suporte foi imprescindível para mim.

Meu agradecimento especial à minha madrinha, Janaina, por seu apoio constante desde os primeiros passos na minha carreira profissional e acadêmica, o que foi essencial para tornar este sonho uma realidade. Aproveito para estender a todos os meus familiares, que, de alguma forma, foram importantes para a conclusão desta etapa em minha vida.

Aos meus amigos de São João Nepomuceno e Juiz de Fora [B.b], por todo o incentivo, paciência e compreensão pelos momentos em que estive ausente. Aproveito para agradecer pelas novas amizades durante esta trajetória em São José do Rio Preto, em especial, ao meu amigo Danilo, um irmão que fiz durante este período.

Expresso minha sincera gratidão ao Tiago Casella pelos valiosos conhecimentos compartilhados, a paciência, a confiança depositada, a amizade e o suporte constante. Sou imensamente grato pela oportunidade de crescimento profissional extraordinário que me foi dada durante esta jornada, algo que carregarei por toda a minha vida. Guardarei para sempre as incontáveis ocasiões em que pude contar com sua ajuda e apoio.

Agradeço, também, à professora Mara Corrêa Lelles Nogueira por toda confiança, ensinamento e carinho. Afinal, foi a peça fundamental para a minha vinda à FAMERP. Aproveito, também, para agradecer aos membros do Laboratório de Virologia, liderado pelo professor Maurício Lacerda Nogueira, onde a colaboração e a contribuição foram de extrema importância para o desenvolvimento deste projeto. Em especial, à Prof. Dr^a Cássia e à Prof. Dr^a Cecília por todos os ensinamentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi, pela importante parceria e por todas as sugestões no projeto. Além de ter me recebido, com muito carinho, em seu grupo de estudo. Aproveito para estender os meus agradecimentos aos integrantes do laboratório de Biologia Molecular Bacteriana (LABMB) – UNICAMP, em especial, à Carol, Yessica e Marina. Agradeço, também, ao Prof. Dr. Nilton Lincopan – USP por todo o auxílio e parceria com o nosso grupo de estudo.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório, Caroline Rodrigues, Letícia Andrade, Katia, Luísa e Letícia Kalir pelos momentos de descontração e risadas, pelo auxílio nos experimentos e pelo aprendizado compartilhado. Meus sinceros agradecimentos também a todos os estagiários que me acompanharam e apoiaram durante este período no Centro de Investigação de Microrganismos, em especial, à Vitória e à Caroline Atuí pela ajuda nos experimentos, e à Beatriz Oshiro, pelas pesquisas minuciosas nos prontuários.

Agradeço aos integrantes permanentes do laboratório CIM, Valéria, Luciana e ao Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini, pela cooperação técnica ao longo deste trabalho e durante todo o período em que estive no laboratório.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração desta tese. Suas colaborações foram importantes para o alcance desta conquista.

“Cada dia é uma chance pra ser melhor que ontem”

Emicida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos em bactérias Gram-negativas..	22
Figura 2: Perfil de suscetibilidade antimicrobiana de isolados Kp-KPC obtidos de sítios de infecções.....	43
Figura 3. Parâmetros da montagem do genoma dos Isolados de Kp-KPC.	52
Figura 4: Árvore filogenética das 51 Kp-KPC pertencentes a ambos os grupos..	53
Figura 5: Genes de resistência detectados no genoma de 51 Kp-KPC.....	58
Figura 6: Viruloma dos 51 isolados de Kp-KPC.....	59
Figura 7: Plasmidoma dos 51 isolados de Kp-KPC..	62
Figura 8: Mobiloma dos 51 isolados de Kp-KPC.	63
Figura 9: Representação da composição do pangenoma de 51 isolados de Kp-KPC do estudo.....	65
Figura 10: Construção filogenética dos Kp-KPC contendo as anotações gênicas que divergiram estatisticamente entre os grupos.....	66
Figura 11: Representação esquemática da composição das anotações gênicas relacionadas ao grupo ONLYCOL que foram carregadas de forma contíguas.	67
Figura 12: Representação esquemática da composição das anotações gênicas relacionadas ao grupo COLINFEC detectadas em regiões próximas, dentro de um mesmo <i>contig</i>	72
Figura 13: Mortalidade em modelo de infecção em larvas de <i>G. mellonella</i> após o desafio com representantes de ambos os grupos.....	74
Figura 14: Mortalidade em modelo de infecção em <i>G. mellonella</i> após o desafio com representantes de diferentes linhagens ao longo de 72 horas.	75

Figura 15: Sobrevivência em modelo de infecção em *G. mellonella* após o desafio com as linhagens ST 11-KL64 e ST 502-KL50 em diferentes concentrações77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência de isolados Kp-KPC em diferentes amostras clínicas	41
Tabela 2: Dados clínicos e demográficos dos pacientes	46
Tabela 3: Número e frequência (%) de resistência dos isolados de Kp-KPC obtidos de ambos os grupos.....	49
Tabela 4: Produção de biofilme por isolados de Kp-KPC obtidos de ambos os grupos	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem, por cento
≤	Menor ou igual a
≥	Maior ou igual a
mg/L	Miligramas por litro
mg/mL	Miligramas por mililitro
mM	Milimolar
ng/μL	Nanogramas por microlitro
μL	Microlitro
°C	Grau Celsius
β	Beta
μL	Microlitro
AK	Amicacina
AMP	Ampicilina
BHI	Infusão cérebro-coração (<i>Brain Heart Infusion</i>)
<i>bla</i>	β -lactamase
BRCAT	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CAZ	Ceftazidima
CC	Complexos Clonal
CIP	Ciprofloxacina
CLI	Clindamicina
CN	Gentamicina
COVID-19	<i>Coronavírus Disease 2019</i>
CRO	Ceftriaxona
CTX-M	Cefotaximase
CVC	Cateter venoso central
CVD	Cateter vesical de demora
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenodamino tetra-acético
EPIs	Equipamentos de Proteção Individual
ESBL	β -Lactamases de Espectro Estendido
ETP	Ertapenem
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FEP	Cefepima
h	Horas
IMI	Imipenem
IMP	Metalobetalactamase tipo Imipenemase
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IS	Sequência de Inserção
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LB	Luria-Bertani
LEV	Levofloxacin
Mb	Megabase
MBL	Metallo- β -lactamases da classe B
MDR	Microrganismos resistentes a múltiplas drogas
MER	Meropenem
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
NDM	<i>New Delhi metallo-β-lactamase</i>
NPP	Nutrição parenteral periférica
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilina
pb	Par de base
PB	Polimixina B
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEN	Penicilina

PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PTZ	Piperacilina/tazobactam
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome - Coronavirus-2</i>
SHV	Beta-lactamase de classe A (<i>sulfhydryl reagent variable</i>)
ST	<i>Sequence type</i> – Sequência Tipo
SXT	Sulfametoxazol/Trimetoprima
TBE	Tampão de Tris-Borato-EDTA
TEM	Beta-lactamase do tipo A (Temoneira)
TIG	Tigeciclina
TSA	Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana
TSB	Caldo Triptona-Soja
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages</i>
UTI	Unidade de terapia intensiva
VAN	Vancomicina
VMI	Ventilação mecânica invasiva
WGS	<i>Whole genome sequencing</i>
XDR	Extensivamente resistentes a drogas

RESUMO

BARROSO, Marlon do Valle. Caracterização fenotípica e genotípica de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC: Investigação da associação entre colonização e infecção. 2024.121 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

Introdução: As infecções nosocomiais são, frequentemente, associadas à *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC (Kp-KPC). O trato gastrointestinal funciona como um importante reservatório para essas cepas, e a colonização prévia é um importante fator de risco para o desenvolvimento da doença. Apesar disso, as razões pelas quais alguns pacientes com estados de saúde semelhantes e carreadores de Kp-KPC progridem para infecção, enquanto outros não, permanecem indefinidas.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi identificar determinantes genéticos presentes em isolados de Kp-KPC que possam contribuir para a transição da colonização para a infecção. **Material e Métodos:** Foi realizado um estudo retrospectivo entre maio de 2018 a junho de 2021, em que 374 isolados Kp-KPC obtidos de culturas de vigilância e amostras de infecção foram selecionados para análise do perfil fenotípico de resistência e tipagem molecular por *Xba*I-PFGE. **Resultados:** A população de Kp-KPC estudada apresentou uma ampla diversidade genética e resistência a quase todos os antibióticos testados. A maioria dos pacientes (69,8%) estava na UTI no momento em que foi realizada a coleta da amostra para análise microbiológica, demonstrando ser uma coorte que demanda cuidados especiais. A partir da tipagem por *Xba*I-PFGE, 51 isolados foram selecionados para uma caracterização mais detalhada e subdivididos em dois grupos: 24 Kp-KPC foram categorizados apenas como colonizadores (ONLYCOL) e 27, como colonizadores que transitaram para infecção (COLINFEC). Os Kp-KPC de ambos os grupos foram selecionados para o sequenciamento completo do genoma (WGS) e ensaios fenotípicos adicionais, como teste de produção de biofilme, perfil de suscetibilidade aos antibióticos e capacidade de infecção em *Galleria mellonella*. Os ensaios de resistência aos antibióticos e de biofilme não mostraram diferenças significativas entre os grupos ONLYCOL e COLINFEC. O *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) revelou oito sequências tipo – ST, sendo aquelas do complexo clonal 258 (ST 11 e ST 340) predominante em ambos

os grupos. Entretanto, a ST 16 esteve associada ao grupo COLINFEC ($p = 0,034$). O alelo *bla*_{KPC-2} esteve presente em todos os 51 isolados selecionados. Yersiniabactina e a toxina colibactina (*clb-3*) foram amplamente representativas em ambos os grupos. O replicon IncF foi prevalente entre os isolados e esteve mais associado ao gene *bla*_{KPC-2} no grupo COLINFEC. A análise genômica comparativa identificou sete anotações associadas ao grupo COLINFEC ($p < 0,01$), incluindo duas sequências de inserção (família IS5 e família ISNCY), uma protease (HtpX), uma proteína de choque térmico (IbpA), a proteína de antiterminação Q, a fosfolipase D e uma proteína hipotética. Por outro lado, anotações relacionadas ao metabolismo de metais, sais e minerais foram associadas ao grupo ONLYCOL. Kp-KPC do grupo COLINFEC mostraram maior virulência em larvas *G. mellonella* nas primeiras 24 horas de infecção, sendo que a linhagem ST 11-KL64 demonstrou alta mortalidade das larvas, mesmo em baixas concentrações. **Conclusão:** Em conclusão, este estudo relata elementos, especificamente, associados à infecção, como a ST 16 e sete anotações genéticas. Estas descobertas contribuem para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à patogenicidade de Kp-KPC e podem ter implicações para o desenvolvimento de futuras intervenções direcionadas à prevenção.

Palavras-chave: Infecções nosocomiais, *K. pneumoniae* produtora de KPC; colonização e infecção, pangenoma

ABSTRACT

BARROSO, Marlon do Valle. Phenotypic and genotypic characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: Investigation of the association between colonization and infection. 2024. 121 f doctoral thesis (Health Sciences) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

Introduction: Nosocomial infections are often associated with KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* (Kp-KPC). The gastrointestinal tract acts as an important reservoir for these strains, and previous colonization is an important risk factor for developing the disease. Despite this, the reasons why some patients with similar health status and Kp-KPC carriers progress to infection, while others do not, remain elusive.

Objective: The aim of this study was to identify genetic determinants present in Kp-KPC isolates that may contribute to the transition from colonization to infection.

Material and Methods: A retrospective study was carried out between May 2018 and June 2021, in which 374 Kp-KPC isolates obtained from surveillance cultures and infection samples were selected for analysis of the antibiotic susceptibility test and molecular typing by *Xba*I-PFGE. **Results:** The Kp-KPC population studied showed a wide genetic diversity and resistance to almost all the antibiotics tested. Most of the patients (69.8%) was in the ICU at the time the sample was taken for microbiological analysis, demonstrating that this is a cohort that requires special care. From the *Xba*I-PFGE typing; 51 isolates were selected for further characterization and subdivided into two groups: 24 Kp-KPC were categorized as colonizers only (ONLYCOL) and 27 as colonizers that transitioned to infection (COLINFEC). Kp-KPC from both groups were selected for whole genome sequencing (WGS) and additional phenotypic assays, such as biofilm production test, antibiotic susceptibility test and ability to infect *Galleria mellonella*. The antibiotic resistance and biofilm assays showed no significant differences between the ONLYCOL and COLINFEC groups. Multi Locus Sequence Typing (MLST) revealed eight ST-type sequences, with those of the 258 clonal complex (ST 11 and ST 340) predominating in both groups. However, ST 16 was associated with the COLINFEC group ($p = 0.034$). The *bla*_{KPC-2} allele was present in all 51 selected isolates. Yersiniabactin and colibactin toxin (*clb*-3) were widely representative in both groups. The IncF replicon was prevalent among the isolates and was more associated with the *bla*_{KPC-2} gene in the COLINFEC group. Comparative

genomic analysis identified seven annotations associated with the COLINFEC group ($p < 0.01$), including two insertion sequences (IS5 family and ISNCY family), a protease (HtpX), a heat shock protein (*lbpA*), the Q antitermination protein, phospholipase D and a hypothetical protein. On the other hand, annotations related to the metabolism of metals, salts and minerals were associated with the ONLYCOL group. Kp-KPCs from the COLINFEC group showed greater virulence in *G. mellonella* larvae in the first 24 hours of infection, and the ST 11-KL64 strain showed high larval mortality, even at low concentrations. **Conclusion:** In conclusion, this study has reported elements specifically associated with infection, such as ST 16 and seven gene annotations. These findings contribute to the understanding of the molecular mechanisms underlying the pathogenicity of Kp-KPC and may have implications for the development of future interventions aimed at prevention.

Keywords: Nosocomial infections, KPC-producing *K. pneumoniae*; colonization and infection, pangenome

1 INTRODUÇÃO

O avanço das bactérias resistentes aos antibióticos compromete os sistemas de saúde em todo o mundo, colocando em dúvida a eficácia dos antibióticos, que revolucionaram a Medicina e salvaram milhões de vidas ¹. No ambiente hospitalar, uma parcela importante das infecções nosocomiais está associada à *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos (Kp-RC) ^{2,3}. Dentre as principais infecções, destacam-se pneumonia, bacteremia, infecção do trato urinário e ferida operatória. Essas situações representam um sério problema de saúde pública devido à limitação de antimicrobianos disponíveis para o tratamento ^{4,5}.

Os carbapenêmicos são antibióticos da classe dos β -lactâmicos, um dos grupos de antibióticos mais prescritos no tratamento de infecções bacterianas graves e, em muitos casos, considerado como último recurso terapêutico ⁶. Dentre os principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos reportados destacam-se as enzimas carbapenemases ⁷; sendo a KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) a que apresenta maior ocorrência no Brasil ⁸. Essas enzimas atuam hidrolisando o anel β -lactâmico, resultando na inativação da droga por não conseguir se ligar mais ao seu alvo, tornando-os ineficazes no tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* produtora de KPC (Kp-KPC) ⁹.

Comumente, as infecções causadas por Kp-KPC resultam em um período prolongado de internação. Consequentemente, as chances de um desfecho positivo por parte dos pacientes diminuem drasticamente ^{2,8}. Além disso, infecções nosocomiais, geralmente, resultam em consequências econômicas devastadoras. Somente nos Estados Unidos, os custos de saúde devido às infecções causadas por bactérias multirresistentes respondem por mais de US\$ 20 bilhões anualmente ¹⁰. No Brasil, foram relatados custos significativamente mais elevados associados às infecções relacionadas à assistência de saúde (IRAS) causadas por bactérias multirresistentes (MDR) em comparação com os custos relacionados aos pacientes que contraíram infecções por bactérias não multirresistentes ¹¹.

A colonização prévia por Kp-RC é um dos principais fatores de risco para o surgimento de infecções nosocomiais que podem evoluir a óbito, principalmente, entre pacientes que apresentam comorbidades. Alguns trabalhos têm relatado que 10-30%

dos pacientes colonizados evoluem para infecção ¹². Adicionalmente, o estado geral de saúde do paciente, bem como, a submissão a antibioticoterapia e procedimentos invasivos, também são fatores de risco a serem considerados tanto para o estabelecimento da colonização quanto para a infecção por Kp-RC ¹³. Contudo, essa condição explica, parcialmente, o processo de evolução da infecção, não havendo uma compreensão clara sobre o porquê de alguns pacientes com quadro de saúde similar colonizados por essas bactérias progredirem para um quadro de infecção enquanto outros não ^{14,15}.

Mesmo com essas importantes lacunas em relação ao tema, a maioria dos estudos envolvendo Kp-RC é direcionado a isolados obtidos de sítios clínicos e, raramente, em culturas de vigilância, que, normalmente, refletem uma situação de colonização do paciente pelo patógeno ⁸. Além disso, os estudos envolvendo estes e outros patógenos concentram em características clínicas dos pacientes e na relação clonal entre os isolados. Dessa forma, a busca por determinantes genéticos relacionados à evolução de uma situação de colonização para de um quadro infeccioso tem sido pouco explorada, com raros relatos ^{15,16}.

A habilidade de uma bactéria progredir da situação de colonização para a de infecção vai depender de diversos fatores, incluindo a maquinaria genética da bactéria. Os determinantes genéticos associados à resistência e à virulência de *K. pneumoniae* estão muito bem estudados ³. No entanto, existem diversos outros genes ao qual a função no papel de patogenicidade ainda é desconhecida, e precisam ser mais bem elucidados, tais como, fatores de transcrição, proteases, chaperonas, elementos genéticos móveis, entre outros. Além disso, inúmeros determinantes de patogenicidade podem variar e serem compartilhados entre diferentes espécies, havendo muitas informações que podem ser exploradas tanto no genoma central (core) da bactéria quanto no genoma acessório ¹⁷.

A composição genética de *K. pneumoniae* oferece uma oportunidade única para realizar estudos comparativos que visam uma melhor compreensão do processo de patogênese. Essa complexidade genética pode oferecer o entendimento para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras e direcionadas, visando superar os desafios crescentes associados à resistência bacteriana ^{17,18}.

Recentemente, alguns genes que não eram conhecidamente envolvidos no processo de patogenicidade (ex. proteínas de regulação, enzimas associadas à recombinação do DNA, enzimas de sinalização, proteínas relacionadas com resistência aos metais pesados, etc.) apresentaram relação direta no processo de infecção causada por diferentes espécies de *Klebsiella* ¹⁶. Adicionalmente, os autores confirmaram a importância de alguns desses genes na capacidade de *K. pneumoniae* em conseguir se estabelecer e colonizar o trato gastrointestinal de pacientes provenientes de diferentes unidades de saúde.

Na coorte apresentada no presente estudo, pacientes admitidos em um hospital de nível terciário estiveram colonizados por Kp-KPC também apresentaram infecção por Kp-KPC. Uma vez que tais pacientes, possivelmente, apresentavam estado de saúde geral semelhante, devido à característica da instituição, concebeu-se a hipótese de que fatores genéticos próprios da bactéria deveriam estar diferenciando aqueles isolados que, subsequentemente à colonização, participaram do processo infeccioso, daqueles que foram detectados somente colonizando os pacientes. Para verificar essa proposição, o presente estudo teve como objetivo a investigação de determinantes genéticos candidatos a estarem associados à patogenicidade de isolados de Kp-KPC que colonizam pacientes internados na referida instituição. Se bem-sucedidos, esses dados poderão auxiliar na predição desta capacidade dos isolados em progredir da condição de colonização para infecção, servindo como um ponto crítico de intervenção naqueles de maior gravidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é uma espécie de bactéria Gram-negativa pertencente à família Enterobacteriaceae, ordem taxonômica Enterobacterales ^{19,20}. As células apresentam formato de bastonete e possuem cápsula polissacarídica, além de realizarem respiração anaeróbia facultativa. Essa espécie pode ser encontrada em, praticamente, qualquer ambiente, como solo, água, plantas e animais. Em humanos,

é parte da microbiota normal da nasofaringe e do trato gastrointestinal ²⁰. Além disso, essa espécie é oportunista, mas pode causar infecção, principalmente, em pacientes imunocomprometidos, especialmente, crianças e idosos ^{21,22}. Resultado deste evento é que, em média, ocorrem 1,6 milhão de mortes neonatais por sepse por *K. pneumoniae*, principalmente, em países de baixa e média renda ^{4,23,24}.

Dentre as principais infecções associadas a esta bactéria, destacam-se as infecções dos tratos urinário e respiratório, infecções de corrente sanguínea, meningite e infecções de sítio cirúrgico ^{4,5}. Fora do ambiente hospitalar, *K. pneumoniae* também pode atuar como um patógeno, ou seja, pode causar infecções graves em pessoas saudáveis que não apresentam fatores de risco associados. Neste caso, quando a doença é de origem comunitária, geralmente, está relacionada a determinantes genéticos associados à hipervirulência do patógeno, e essas infecções incluem endoftalmite, pneumonia, fascíte necrosante, abscesso não hepático, meningite e abscesso hepático piogênico ^{17,22}.

Historicamente, cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* (Kp-Hv) são menos associadas a surtos em ambientes hospitalares e são consideradas mais suscetíveis aos antibióticos quando comparadas às linhagens clássicas não-hipervirulentas no ambiente hospitalar. No entanto, alguns estudos têm relatado a presença de isolados de Kp-Hv resistentes a diversos antibióticos em unidades de saúde ²⁵. Apesar disso, a principal ameaça dentro dos ambientes hospitalares continua sendo as linhagens clássicas não-hipervirulentas resistentes a diversos antibióticos, inclusive àqueles considerados como última opção terapêutica para casos graves, como os carbapenêmicos ^{17,26,27}.

2.2 Carbapenemases: uma ameaça à terapia antimicrobiana

Os carbapenêmicos, antibióticos da classe dos β -lactâmicos, representam um dos mais importantes grupos prescritos no tratamento de infecções bacterianas graves. No entanto, diversos trabalhos têm relatado *K. pneumoniae* resistentes a essas drogas ^{6,28,29}. Em 2017, Kp-RC foi reconhecida como uma ameaça crítica à saúde pública pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que enfatizou a necessidade urgente de novos antibióticos ⁶. Somente na Europa, essas bactérias são responsáveis por mais de 90.000 infecções e 7.000 mortes por ano ³⁰. Embora haja

escassez de dados epidemiológicos em algumas regiões, as evidências sugerem que a ocorrência de Kp-RC tem apresentado uma tendência ascendente em todo o mundo^{17,30}.

A resistência aos carbapenêmicos pode ocorrer por múltiplos mecanismos, incluindo alteração da permeabilidade da membrana externa mediada pela perda de porinas, superexpressão de bombas de efluxo, e, mais comumente, por produção de enzimas carbapenemases⁷ (**Figura 1**). Essas enzimas hidrolisam o anel β -lactâmico de todos os representantes dessa classe de antibióticos, e são classificadas de acordo com sua estrutura molecular (classes A, B, C ou D) ou por sua funcionalidade (grupos de 1 a 4, com subdivisões). Dentre os tipos de carbapenemases mais recorrentes, as KPC, as oxacilinasas do tipo 48 (OXA-48-like) e as Nova Delhi metalo- β -lactamases (NDM) se destacam pela sua prevalência em Kp-RC em todo o mundo¹³.

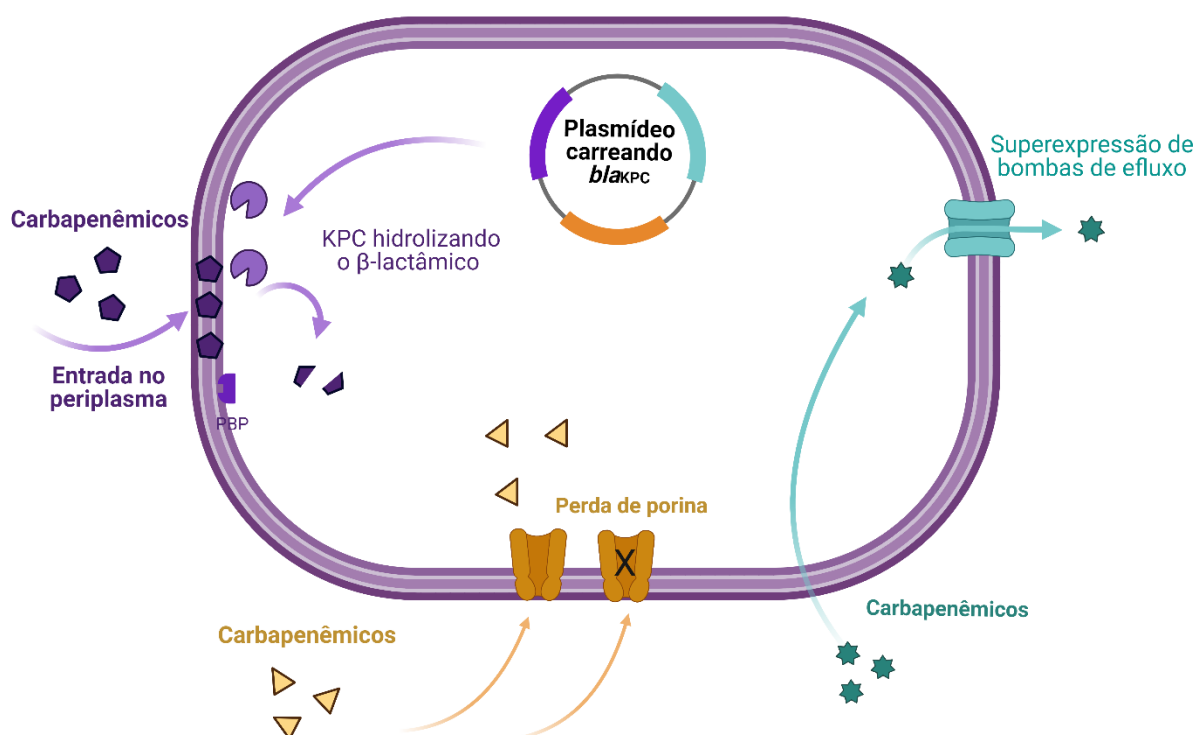


Figura 1: Representação esquemática dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos em bactérias Gram-negativas. Alguns dos principais mecanismos são mediados pela resistência adquirida por plasmídeos: redução da entrada do medicamento através da membrana celular devido à perda ou modificação de porinas, degradação dos β -lactâmicos no espaço periplasmático pelas β -lactamases do tipo KPC e aumento da expressão de bombas transmembrana que causa o efluxo das moléculas da droga que atingem o citoplasma. Imagem construída utilizando a ferramenta Biorender.

No Brasil, estudos têm demonstrado que a enzima KPC representa o tipo mais relevante no cenário clínico dentre as carbapenemases produzidas por *K. pneumoniae*, com alta prevalência e transmissão entre unidades hospitalares^{8,31–33}, sendo, essa ocorrência, variável geograficamente³⁴. Estudos prévios demonstraram maior prevalência de NDM e KPC nos Estados Unidos, Canadá, Grécia, Colômbia e China, enquanto na Turquia e no norte da África há maior ocorrência de OXA-48^{13,35–37}. Neste contexto, o aumento de fatores como migração e globalização pode levar a mudanças nesses mecanismos de resistência entre diferentes regiões; uma vez que os determinantes genéticos estão comumente associados a elementos móveis, que podem ser transferidos facilmente por transferência horizontal³⁸.

Os genes *bla_{KPC}* são, frequentemente, carregados por plasmídeos e associados a elementos genéticos móveis menores, tais como sequências de inserção (IS) ou transposons, sendo o Tn4401 seu principal carreador em *K. pneumoniae*³⁹. Vários grupos de plasmídeos foram relatados carregando o cassete gênico contendo *bla_{KPC}*; no entanto, os replicons mais reportados são IncF, IncA/C, e IncX⁹. Neste sentido, a investigação epidemiológica dos genes de carbapenemases e dos elementos genéticos que os mobilizam é de extrema importância, visto que o tipo da enzima carregado pode influenciar na terapia antimicrobiana empregada para tratar infecções graves⁴⁰.

2.3 Principais linhagens de *K. pneumoniae* associadas a infecções

As infecções por *K. pneumoniae* são causadas por diversas linhagens amplamente distribuídas geograficamente. No entanto, um subconjunto destas contribui desproporcionalmente para doenças globais, sendo nomeadas “clones de alto risco”. Dentre os clones mais recorrentes no ambiente hospitalar, colonizando e causando infecção em pacientes destacam-se aqueles pertencentes ao complexo clonal (CC) 258, cujas principais Sequência Tipo (*Sequence Type* – ST) são ST 11, ST 258, ST 340 e ST 437^{8,39}. Globalmente, este complexo clonal de alto risco é considerado o mais importante na disseminação do gene *bla_{KPC}*, inclusive no Brasil⁸. Além disso, este CC abriga vários outros genes de resistência aos antibióticos, com

destaque para o ST 11 que é um clone extensivamente resistente a drogas (XDR) disseminado mundialmente ^{41,42}.

Apesar das linhagens do CC 258 representarem uma importante parcela das infecções nosocomiais, outras ST associadas à produção de carbapenemases têm sido cada vez mais relatadas causando infecções severas e fatais ⁴³. Linhagens de *K. pneumoniae* ST 16 também estão associadas às múltiplas carbapenemases, tais como, KPC, NDM e OXA-48, e tem se tornado clinicamente relevante, com ampla propagação mundial ^{37,44,45}. Sua associação com surtos nosocomiais, e relatos de maior virulência, quando comparado ao ST 258, em modelos de patogenicidade em organismos modelo, sugere que este clone possui determinantes genéticos que merecem ser investigados com maior atenção ^{45,46}.

Em um estudo realizado por Andrey e colaboradores ⁴⁵, foi relatado que isolados de *K. pneumoniae* ST 16 produtores de KPC estiveram associados a uma maior taxa de mortalidade em um hospital onde, historicamente, as linhagens do CC 258 eram endêmicas. Em outros estudos, foi possível observar a presença dessas linhagens colonizando crianças e adultos onde, comumente, as linhagens do CC 258 são as principais colonizadoras ^{8,47}. Gradativamente, o clone ST 16 está se consolidando como uma ameaça aos sistemas de saúde. Apesar disso, poucos estudos foram realizados para investigar os determinantes genéticos que podem estar por trás da crescente adaptação dessa linhagem às unidades de saúde ⁴⁸.

2.4 Fatores de risco e progressão da infecção

No cenário clínico, uma fração considerável das IRAS está relacionada a isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC. As IRAS são reconhecidas como um desafio de saúde global, pois contribuem para o aumento da mortalidade, prolongam o tempo de internação na UTI e elevam os custos hospitalares ^{2,3}. As IRAS englobam diversas infecções, incluindo infecções da corrente sanguínea, infecções do trato urinário associadas a cateter, pneumonia associada à ventilação mecânica e infecções de sítio cirúrgico ⁴⁹.

Uma vez que estudos sobre vigilância epidemiológica têm indicado que o trato gastrointestinal é um importante reservatório de linhagens de *K. pneumoniae* causadoras de IRAS ^{2,50}, a colonização deste sítio anatômico por Kp-KPC, na maioria das vezes, advém da constante terapia com antibióticos de amplo espectro, que exerce pressão seletiva sobre esses microrganismos ¹⁷. Este fato implica em outro importante fator de risco que contribui para a progressão da doença por Kp-KPC: a saúde do paciente, em especial aqueles em estado grave e que necessitam de terapia prolongada com antimicrobianos, apresentam longa permanência em unidade de terapia intensiva (UTI), e são submetidos a procedimentos e dispositivos invasivos, como cateter venoso central (CVC), cateter vesical de demora (CVD) e nutrição parenteral periférica (NPP) ^{15,51}.

Além desses fatores de riscos, estudos têm relatado outros parâmetros clínicos que possam estar associados ao processo da doença, como o uso prévio de inotrópicos, baixo nível de albumina, realização de diálise, doença hepática crônica, transplante de órgãos sólidos e câncer ^{15,52}. Apesar disso, essas condições explicam, parcialmente, o processo de evolução da infecção ¹⁵, uma vez que, quanto maior a abundância de *K. pneumoniae* no trato gastrointestinal, maior o risco de um paciente colonizado evoluir para o quadro de infecção ¹⁴.

A colonização prévia por Kp-KPC é um dos principais fatores de risco para o surgimento de infecções nosocomiais que podem evoluir a óbito, principalmente, entre pacientes que apresentam comorbidades ^{2,53}. Porém, não existe uma compreensão concreta estabelecida na literatura sobre o motivo de algumas linhagens apresentarem maior facilidade em colonizar e se estabelecer no trato gastrointestinal em relação às outras. Também, é incerto o porquê de alguns pacientes com quadro de saúde semelhante, colonizados por Kp-KPC, progredirem para um quadro de infecção enquanto outros não.

De maneira geral, a habilidade de uma bactéria progredir da situação de colonização para a de infecção vai depender de diversos fatores, incluindo aqueles de virulência da bactéria, condição imunológica do hospedeiro, condições ambientais, e exposição prévia aos antimicrobianos ⁵³. Para linhagens de Kp-Hv, os determinantes genéticos associados a este fenótipo são muito bem elucidados por técnicas de epidemiologia molecular e estudos experimentais *in vivo* ⁵⁴. Porém, pouco se conhece

sobre o papel da maquinaria genética das linhagens de Kp-KPC não-hipervirulentas na colonização e na progressão da doença ¹⁷.

2.5 Estrutura populacional e determinantes genéticos associados à patogenicidade

O tamanho do genoma de *K. pneumoniae* varia entre 5 e 6 Mb, o que resulta na codificação de 5.000 a 6.000 genes. Aproximadamente, 1.700 genes são conservados em todos os membros da espécie, ou seja, constituem o genoma central (core), enquanto o restante está presente de forma variável (genes acessórios) ^{41,55}. Dessa forma, o genoma de *Klebsiella* oferece uma oportunidade única para realizar estudos genômicos comparativos e compreender os mecanismos patogênicos desta espécie ⁴². De fato, o pangenoma (genoma central mais o genoma acessório) é bastante diverso, e é possível que exceda 100.000 genes únicos ^{17,41}, sendo, alguns deles, considerados importantes no processo de colonização e subsequente infecção de pacientes em estado crítico ¹⁷.

A capacidade de cepas de *K. pneumoniae* causarem doença em humanos é influenciada por diversos fatores genéticos. De um modo geral, todas as linhagens de *K. pneumoniae* contêm fatores essenciais de patogenicidade que formam os requisitos básicos para o estabelecimento de infecções oportunistas nos hospedeiros ⁵⁶. No entanto, vale ressaltar que o conteúdo gênico contido no genoma acessório é o principal responsável pelo aumento da virulência e o sucesso deste patógeno no ambiente hospitalar ¹⁷.

Dentre os principais determinantes presentes no pangenoma associados à virulência encontrada em cepas clássicas e/ou hipervirulentas, destacam-se os sideróforos (enterobactina, yersiniabactina, aerobactina e salmoquelina), que compreendem moléculas quelantes de ferro que podem eliminar competitivamente o ferro das proteínas do hospedeiro ou de outras fontes ^{57,58}; a capacidade de metabolizar alantoína (*all loci*); a produção de fímbrias do tipo 1 (*fim loci*) e tipo 3 (*mrk loci*), que estão envolvidas na adesão e formação de biofilme; e produção de polissacarídeo capsular (antígeno K) e LPS (antígeno O), que auxiliam no processo de evasão do sistema imune e na interação com as células hospedeiras ^{17,41,59}.

Também existem as bombas de efluxo AcrAB que, apesar desempenharem um importante papel na resistência aos antibióticos, atuam no processo de extrusão de peptídeos antimicrobianos que são componentes importantes do sistema imunológico inato do hospedeiro ⁶⁰. Ainda, o fenótipo de hiper mucoviscosidade associado à presença de genes reguladores (*rmpA* e *rmpA2*), bem como, a produção da toxina colibactina, que é capaz de induzir danos ao DNA das células hospedeiras ^{17,58}, são importantes fatores relacionados à virulência na espécie. Além disso, outras plataformas genéticas, tais como, os elementos móveis (sequências de inserção, transposons, elementos conjugativos integrativos – ICE – e plasmídeos), têm sido cada vez mais associadas à patogenicidade ^{16,61}.

Entretanto, existem diversos determinantes genéticos ao qual a função de patogenicidade ainda é desconhecida ⁶¹. Inúmeros determinantes presentes em elementos genéticos móveis podem variar entre as linhagens, havendo muitas informações que podem ser exploradas tanto no genoma core quanto no acessório ¹⁷. Recentemente, foram identificados elementos genéticos associados a, ou que contribuíram para, o processo de infecção por *Klebsiella* spp. em pacientes em estado grave, quando comparados ao grupo controle. Tais elementos, alguns dos quais alteram a função fisiológica da bactéria, foram identificados como os genes *aqpZ* (aquaporina), *tehA* (resistência ao telúrio), *arsD* (resistência ao arsênio), e *dgcE* (diguanylate-ciclase), além dos elementos genéticos móveis *ISEcp1*, *Tn3*, *IS6100*, e *umuDC*, e dos genes de resistência a antibióticos *aac(6')-Ib-cr*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{OXA-1}*, e *bla_{TEM-1}* ¹⁶.

Outras evidências também já foram relatadas ³. Neste caso, os autores detectaram anotações gênicas independentes e significativamente associadas à infecção em pacientes hospitalizados. Os genes foram associados ao metabolismo de carboidratos, ácidos e pentoses fosfato (*DeoR* proteína da família *DeoR*/fosfatase alcalina, desoxigluconato desidrogenase e aldolase desoxirribose-fosfato, respectivamente). Além dessas, uma proteína de resistência ao telúrio, *TerF*, e uma proteína hipotética também apareceram no grupo dos isolados associados à infecção.

Neste sentido, o uso de ferramentas de genômica comparativa a partir de dados de sequenciamento total do genoma (WGS) de *K. pneumoniae* multirresistentes, que apresenta um modelo ideal para este tipo de estudo, deve ser explorado para permitir

uma melhor compreensão sobre o potencial patogênico de diferentes linhagens ⁶¹. Adicionalmente, ensaios envolvendo modelos animais para verificar essa capacidade de infecção podem fornecer uma melhor compreensão da capacidade e deste processo de patogenicidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População-alvo e isolados de estudo

O presente estudo foi conduzido no Centro de Investigação de Microrganismos, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CIM/FAMERP), com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (número do parecer: 5.039.806, CAAE: 52157921.3.0000.5415).

De maio de 2018 a junho de 2021, os isolados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos (Kp-RC) obtidos de cultura de vigilância e de sítios anatômicos com suspeita de infecção nos respectivos pacientes admitidos no complexo hospitalar Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto (FUNFARME) foram selecionados para este estudo. Assim, todos os pacientes incluídos estiveram colonizados por Kp-RC e também apresentaram, pelo menos, um episódio de suspeita de infecção pelo mesmo tipo de patógeno. Mais de um isolado de Kp-RC foi obtido a partir de diferentes amostras clínicas de alguns pacientes, enquanto, sempre, somente o primeiro isolado de cultura de vigilância foi considerado.

Todas as amostras clínicas foram coletadas para exames laboratoriais de rotina para a comprovação da presença de bactérias nos respectivos sítios anatômicos sob requisição médica, como procedimento padrão para a determinação de infecção ou colonização bacteriana, de tal forma que não houve intervenção específica em qualquer paciente para o desenvolvimento do presente estudo.

As culturas de vigilância foram consideradas esfregaços anais/inguinais com swab estéril, normalmente, coletados dentro de 48 horas da admissão do paciente na instituição. Aqueles pacientes que apresentaram um isolado produtor de carbapenemase do tipo KPC obtido de, ao menos, um sítio anatômico suspeito de

infecção e da cultura de vigilância, tiveram dados clínicos e sociodemográficos (idade, sexo, unidade de internação e data da coleta) recuperados a partir de prontuário eletrônico.

3.2 Identificação e suscetibilidade aos antimicrobianos por método automatizado

Os procedimentos descritos nesta seção foram inteiramente realizados pelos profissionais do setor de microbiologia do laboratório de análises clínicas do complexo hospitalar (LM-FUNFARME). Entretanto, estão, aqui, expostos para que permitam o total entendimento sobre o fluxo de trabalho estabelecido até a seleção das bactérias deste estudo.

Todos os isolados obtidos de sítios de infecção foram identificados e submetidos ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) por microdiluição automatizada em equipamento BD Phoenix™ (Becton Dickinson), de acordo com cada tipo de amostra clínica. Isolados que apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos foram definidos como MDR ⁶².

Isolados obtidos de cultura de vigilância foram identificados da mesma forma, porém sem resultado de TSA, uma vez que a comprovação da resistência aos carbapenêmicos é realizada de acordo com a Nota Técnica Nº 01/2013 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Basicamente, os *swabs* são inseridos em 10 mL de caldo BHI com um disco de ertapenem (10 µg); após incubação, o caldo é semeado em ágar MacConkey com a disposição de dois discos de ertapenem. Bactérias que crescem internamente a um halo de 27 mm ao redor dos discos são consideradas resistentes aos carbapenêmicos.

3.3 Extração de DNA e detecção de carbapenemase do tipo KPC

Os isolados foram investigados quanto à presença da enzima carbapenemase do tipo KPC por reação em cadeia da polimerase (PCR). O DNA genômico bacteriano foi obtido através da técnica de lise térmica. Para tanto, os isolados de Kp-RC foram inoculados em caldo Luria Bertani (LB) e incubados a 37 °C *overnight*. Posteriormente,

foram transferidos para um microtubo de polipropileno de 1,5 mL e centrifugados a $15.000 \times g$ por 15 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado, e o sedimento foi suspenso em 400 µL de água Milli-Q. Após a centrifugação, os microtubos foram deixados em termobloco a 100 °C por 10 minutos e, em seguida, transferidos para gelo por, pelo menos, dois minutos. Após esta etapa de lise, os microtubos foram centrifugados a $15.000 \times g$ por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante contendo o DNA bacteriano foi transferido para um novo microtubo, onde foi armazenado a -20 °C até a sua utilização.

Para a detecção do gene *bla_{KPC}*, foram conduzidos ensaios de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos ⁶³. Para tal, os termocicladores GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, USA) ou T100™ (Biorad Laboratórios Brasil Ltda) foram utilizados. Para cada reação de amplificação, foram utilizados 1 µL (contendo 10 ng/µL) de DNA bacteriano, 0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™), tampão de reação 1× e água Milli-Q (Millipore). O volume final da reação foi de 25 µL. O resultado foi observado por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen™) 1,0%, utilizando 6 µL do produto amplificado, preparado em tampão Tris Borato EDTA (TBE). Durante a eletroforese, utilizou-se um marcador de tamanho molecular de 100 pb Ladder (Invitrogen™). Após, os géis foram corados com 0,8% de brometo de etídio (10 mg/mL) e fotografados com o fotodocumentador LPix Ex (Loccus Biothechnology).

3.4 Tipagem molecular por restrição genômica com endonuclease

Para melhor compreender a relação genética e a capacidade dos isolados Kp-KPC colonizantes supostamente causarem infecção, todos os isolados Kp-KPC foram submetidos à técnica de tipagem molecular por restrição genômica com a endonuclease *Xba*I, seguida de eletroforese em campo pulsado (*Xba*I-PFGE) ⁶⁴.

3.4.1 Preparação dos blocos de agarose

Para a preparação dos blocos de agarose contendo a bactéria (plugs), os isolados foram cultivados em ágar BHI a 37 °C por 18 horas. Células de cada isolado foram utilizadas para preparar suspensões bacterianas em 2 mL de NaCl 0,9%. O ajuste da concentração celular das suspensões foi realizado no espectrofotômetro Colibri (Titertek-Berthold) a 600 nm, com densidade óptica entre 0,8 a 1,3. Em seguida, 100 µL de cada suspensão ajustada foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e centrifugados a $1.000 \times g$ por dois minutos. As células foram suspensas em 50 µL de tampão de suspensão celular (100 mM Tris:100 mM EDTA, pH final = 8) e adicionados 50 µL de agarose Clean Cut 2% (BioRad) a 54 °C. Após breve homogeneização, todo o volume foi distribuído em um molde de confecção de plug. Os plugs foram solidificados em temperatura ambiente e transferidos para 500 µL de tampão de lise (50 mM Tris; 50 mM EDTA; pH final = 8), contendo 1% de lauril sarcosinato de sódio e 0,1 mg/mL de proteinase K.

Em seguida, os plugs foram incubados a 55 °C *overnight* para que ocorresse a lise das células no bloco de agarose. Após a lise, os plugs foram lavados com água Milli-Q e TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH final = 8), mantendo-se a temperatura. Por fim, os plugs foram armazenados a 4 °C até a etapa de digestão do DNA.

3.4.2 Digestão por endonuclease *Xba*I e eletroforese

Foi realizado o corte de um fragmento de cada plug (4,0 mm × 5,0 mm), utilizando um bisturi, e transferido para um microtubo contendo 100 µL de tampão de restrição fornecido com a enzima, contendo 10 U da enzima de restrição *Xba*I (Thermo Scientific, EUA). Os tubos foram suavemente agitados, e o fragmento de plug foi incubado a 37 °C *overnight*. Posteriormente, o tampão de restrição foi removido de cada tubo, e o fragmento de plug foi cuidadosamente posicionado sobre os dentes do pente de eletroforese, sendo um fragmento por dente. Para referenciar os tamanhos dos fragmentos de DNA (marcador), a cepa de *Salmonella enterica* sorotipo Braenderup H9812 foi utilizada como padrão de tamanho molecular de bandas ⁶⁵, cujos plugs foram preparados da mesma forma descrita acima.

Anteriormente ao início da PFGE, foi preparada uma solução de agarose a 1,5% (Sigma Aldrich) com tampão TBE (10× TBE: 0,89 M Tris, 0,89 M ácido bórico e 20 mM EDTA, pH 8,3), a 0,5×, totalizando 150 ml, dos quais cerca de 6 ml foram utilizados

para fixar os fragmentos de cada plug tratado com a enzima *Xba*I (incluindo os marcadores) ao pente. Após a fixação, o restante da agarose foi vertido em um molde apropriado, seguido da acomodação do pente no molde. Após a solidificação da agarose, o pente foi retirado e o molde desmontado, disponibilizando o gel de agarose na cuba de eletroforese de campo pulsado.

O equipamento utilizado foi o PFGE CHEF-DR[®] II (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), sob as seguintes condições: tampão TBE 0,5× a 13 °C; tempo total de eletroforese = 18 horas e 30 minutos; campo elétrico = 6 V/cm; tempo inicial de mudança da direção do campo elétrico = 6,0 segundos; e tempo final de mudança da direção do campo elétrico = 36,0 segundos ⁶⁶. O resultado foi visualizado e fotografado em foto documentador LPix Ex (Loccus, Brasil). O programa BioNumerics[™] (Applied Maths-bioMérieux) versão 7.6 foi utilizado para a construção do dendrograma e agrupamento dos isolados com base no coeficiente de similaridade de Dice e no método da ligação média não ponderada usando médias aritméticas (UPGMA). Isolados com perfil de similaridade genética $\geq 90\%$ foram considerados como pertencentes a um mesmo grupo, e aqueles que apresentaram similaridade $< 80\%$ foram considerados isolados com contexto evolutivo distinto.

3.5 Definição de grupos dos isolados bacterianos

Com a finalidade de melhor compreender as características fenotípicas e genotípicas de Kp-KPC relacionados ao processo de colonização e infecção, os isolados foram divididos em dois grupos: “ONLYCOL”, grupo composto por isolados que apareceram somente colonizando pacientes, e “COLINFEC”, composto por isolados que colonizaram e também causaram infecção em um mesmo paciente.

O grupo “ONLYCOL” foi composto por isolados de Kp-KPC obtidos de cultura de vigilância que apresentaram similaridade genética $< 80\%$ no dendrograma gerado a partir da *Xba*I-PFGE com qualquer outro isolado de Kp-KPC, considerando o mesmo ou qualquer outro paciente incluído no estudo. O grupo “COLINFEC” foi composto por isolados de Kp-KPC obtidos de cultura de vigilância que apresentaram similaridade genética $\geq 90\%$ com algum outro isolado de Kp-KPC proveniente de amostra de sítio infeccioso do mesmo paciente.

3.6 Análise de prontuários eletrônicos dos pacientes

Para uma determinação mais assertiva sobre as possíveis diferenças entre as características fenotípicas e genotípicas dos isolados de Kp-KPC pertencentes aos grupos de estudo, foi realizada uma análise aprofundada do prontuário eletrônico somente dos pacientes referentes aos isolados incluídos nos grupos ONLYCOL ou COLINFEC.

Destes pacientes, os seguintes dados foram extraídos: idade, raça, comorbidades, local de admissão do paciente quando da coleta da cultura de vigilância, admissão prévia em UTI, internações prévias em unidades de assistência à saúde nos últimos 30 dias, encaminhamento de outra unidade de saúde, diagnóstico de infecções prévias considerando os últimos 30 dias, infecções prévias especificamente por *K. pneumoniae*, uso prévio de antibióticos (incluindo β -lactâmicos) nos últimos 30 dias, reincidência de infecção por *K. pneumoniae*, uso prévio de CVD, CVC e/ou NPP, necessidade de hemodiálise, uso de ventilação mecânica, uso de inotrópico, e desfecho da internação. Além disso, foram coletadas informações sobre contagem de hemoglobinas, leucócitos, plaquetas, proteína C reativa, creatinina e albumina em até 48 horas antes ou depois da coleta de cultura de vigilância e de amostras de sítio de infecção. A definição de infecção foi baseada no parecer do médico responsável por cada paciente (constante no prontuário eletrônico), levando em consideração os parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes, conforme recomendação da Anvisa ⁶⁷.

Foi realizada uma análise descritiva com base no quadro clínico dos pacientes. O teste χ^2 de Pearson foi usado para determinar se a frequência esperada nos grupos foi atendida. Um nível de significância de 0,05 foi adotado para todos os testes, e os dados foram tabulados e analisados com auxílio do programa SPSS para IOS (versão 28, SPSS, Inc; Chicago, IL).

3.7 Teste de suscetibilidade aos antibióticos por método de disco-difusão em ágar

Como os isolados incluídos nos grupos ONLYCOL ou COLINFEC foram provenientes de culturas de vigilância, os mesmos não haviam sido previamente submetidos ao teste de suscetibilidade aos antibióticos – TSA automatizado pela equipe do LM-FUNFARME. Dessa forma, com a finalidade de buscar diferenças no fenótipo de resistência aos antibióticos entre os isolados de ambos os grupos, foi realizado o teste de suscetibilidade aos antibióticos por disco-difusão em ágar Müller-Hinton (OXOID). Foram utilizados discos (OXOID) contendo os seguintes antibióticos: amicacina (30 µg), amoxicilina-ácido clavulânico (20/10 µg), cefepima (30 µg), cefoxitina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), ertapenem (10 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), piperacilina/tazobactam (30/6 µg) e sulfametoxazol/trimetoprima (23,75/1,25 µg). Também foi testada a suscetibilidade à polimixina B por microdiluição em caldo, utilizando o *kit* comercial Policimbac® (Probac). O TSA foi realizado e interpretado de acordo com as normas do Comitê Brasileiro de Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos – BrCAST, versão de 2022 ⁶⁸. A cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade.

3.8 Produção de biofilme e fenótipo de hipermucoviscosidade

Assim como foi realizado o teste fenotípico de resistência aos antibióticos, os isolados de Kp-KPC de ambos os grupos foram, também, investigados quanto à capacidade de produção de biofilme. O método da placa de microtitulação foi utilizado para detectar a produção de biofilme entre os isolados dos diferentes grupos. Resumidamente, uma alça fresca do organismo teste foi inoculada em 10 mL de caldo soja tripticase – TSB (MERCK) e incubada a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, a solução foi ajustada para 0,5 McFarland. Em seguida, 20 µL do caldo de cultura foram introduzidos em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços contendo 180 µL de TSB fresco, seguido de incubação a 37 °C por 24 horas. Uma vez concluída a incubação, o conteúdo de cada poço foi removido por batidas suaves, e os poços foram lavados com 200 µL de PBS (Phosphate-Buffered Saline – fosfato de sódio dibásico, cloreto de sódio e cloreto de potássio, pH = 7) de três a quatro vezes para eliminar as bactérias em suspensão. O biofilme formado pelas bactérias que aderiram aos poços foi fixado usando metanol (MERCK) e corado com cristal violeta (SYNTH)

a 0,1%. O excesso de corante foi removido, lavando a placa com água deionizada ⁶⁹. A densidade ótica (OD) do biofilme aderido corado foi, então, aferida em um comprimento de onda de 630 nm usando um leitor de placas Spectramax PLUS® (Molecular Devices)

Os resultados foram interpretados de acordo com os critérios estabelecidos por Stepanovic et al. (2007) ⁷⁰. O valor de corte da OD (OD_c) foi determinado como a média da OD do controle negativo adicionada de três desvios padrão (DP), utilizando a fórmula: OD_c = média da OD do controle negativo + (3 × DP do controle negativo). Os resultados foram categorizados em quatro grupos com base nos valores de OD: i) forte produtor de biofilme (4 × OD_c < OD); ii) produtor moderado de biofilme (2 × OD_c < OD ≤ 4 × OD_c); iii) produtor fraco de biofilme (OD_c < OD ≤ 2 × OD_c); e iv) não produtor de biofilme (OD ≤ OD_c).

O fenótipo de hipermucoviscosidade foi verificado utilizando o teste de *string*, conforme descrito ⁷¹. Brevemente, uma alça de inoculação foi usada para verificar as características morfológicas (viscosidade) das colônias de Kp-KPC a partir de crescimento em ágar sangue (bioMérieux). A formação de fio viscoso com comprimento > 5 mm foi considerada positiva.

3.9 Sequenciamento total do genoma e análises de bioinformática

A fim de obter uma melhor compreensão sobre os determinantes genéticos que possam estar envolvidos com o fenótipo de colonização e patogenicidade, o genoma completo dos isolados de Kp-KPC pertencentes aos grupos ONLYCOL ou COLINFEC foram sequenciados. Para tanto, o DNA total foi extraído utilizando o “bacteria GenomicPrep Mini Spin Kit” (GE Healthcare®). As bibliotecas genômicas foram preparadas utilizando o “Illumina® DNA Prep, (M) Tagmentation” (Illumina, Inc.). A quantificação das bibliotecas foi realizada utilizando o “Qubit dsDNA HS Assay” em equipamento Qubit 2.0 (Invitrogen). O controle de qualidade das bibliotecas foi verificado usando o sistema TapeStation 4150 com o kit “High Sensitivity D1000 ScreenTape” (Agilent Technologies, Inc.) e, então, agrupadas em concentrações equimolares.

Para o sequenciamento, foi utilizado o miSeq Reagent kit v3 (300 cycle) para obter leituras de extremidades emparelhadas de 2×150 bp. O “NextSeq™ PhiX Control” foi utilizado em conjunto, como amostra normalizadora do sequenciamento, e as bibliotecas foram sequenciadas em sistema MiSeq™ (Illumina, Inc.), constante no Laboratório Multiusuário da FAMERP.

As sequências cruas obtidas foram depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI), estando disponíveis para acesso sob o BioProject PRJNA1000963.

3.9.1 Limpeza, montagem e anotação do genoma

A verificação da qualidade dos dados gerados, e o consequente descarte de *reads* de baixa qualidade, bem como a montagem *de novo* dos genomas, foram realizadas utilizando as ferramentas Trimmomatic v. 0.38 ⁷² e SPAdes v. 3.15.3 ⁷³, respectivamente. A qualidade da montagem foi verificada utilizando os programas QUAST v5.0.2 ⁷⁴ e Contigator 2.7.4 ⁷⁵. Todos os genomas montados foram anotados utilizando a ferramenta Prokka v1.14.5 ⁷⁶ devido à sua alta eficiência na anotação de *K. pneumoniae*.

3.9.2 Tipagem por MLST, K-type e O-type

A partir dos genomas montados, foi realizada uma análise mais aprofundada das características genotípicas dos isolados. A Sequência Tipo (ST) e o polissacarídeo capsular (K-type) foram determinados de acordo com o *script* disponibilizado no banco de dados de definições de locus/sequência de *Klebsiella*, disponível em <https://bigsdbs.pasteur.fr/>; enquanto o sorotipo de lipopolissacarídeos (O-type) foi estabelecido com auxílio da ferramenta PathogenWatch via uma implementação do Kleborate (versão 2.0.) ¹⁸, usando parâmetros padrões, disponível em <https://cgps.gitbook.io/pathogenwatch/>.

3.9.3 Resistoma, plasmidoma, mobiloma, viruloma e patogenicidade

O resistoma, o plasmidoma, o mobiloma e a probabilidade de ser um patógeno humano foram caracterizados usando as ferramentas ResFinder 4.1 ⁷⁷, PlasmidFinder 2.1 ^{78,79}, Mobile element finder 1.0.3 ⁸⁰ e PathogenFinder 1.1 ⁸¹, respectivamente, disponíveis no site do Center for Genomic Epidemiology (CGE, <https://cge.cbs.dtu.dk/services/>). Análises adicionais para a detecção de genes de resistência foram realizadas utilizando a ferramenta Kleborate V.2.2.0 ¹⁸, enquanto que análises complementares sobre o mobiloma envolvendo elementos integrativos e conjugativos, sequências de inserção e integrons foram determinados usando ICEberg 2.0 ⁸², ISFinder ⁸³ e IntegronFinder ⁸⁴, disponível em <https://github.com/apache/iceberg/milestone/38>, <https://isfinder.biotoul.fr/howto.php> e https://github.com/gem-pasteur/Integron_Finder, respectivamente. O viruloma foi investigado usando o VFAnalyzer ⁸⁵, disponível no Virulence Factor Database (VFDB), e o Kleborate V.2.2.0. para prever o elemento conjugativo integrativo (ICE) associado a *loci* de virulência [ICEKp – colibactina (*clb*), yersiniabactina (*ybt*)].

Em seguida, uma pontuação baseada nos determinantes genéticos associados à resistência e à virulência foi gerada pelo Kleborate. A pontuação associada à resistência é definida da seguinte forma: 1 = ESBL sem carbapenemase (independentemente da resistência à colistina); 2 = carbapenemase sem resistência à colistina (independentemente da presença de ESBL); e 3 = carbapenemases com resistência à colistina (independentemente de ESBL). Por outro lado, a presença dos genes *ybt*, *clb* e *iuc* é usada para atribuir uma pontuação de virulência da seguinte forma: 0 = nenhum gene presente, 1 = apenas o gene de yersiniabactina (*ybt*), 2 = presença de colibactina (*clb*) sem a presença de aerobactina (*iuc*), 3 = apenas aerobactina, 4 = aerobactina e yersiniabactina, sem colibactina, e 5 = todos os três genes presentes.

3.9.4 Análise de pangenoma

O pangenoma dos isolados de Kp-KPC foi analisado usando a ferramenta Roary v3.13.051 ⁸⁶ para gerar o perfil do pangenoma com um limite de identidade BLAST

v2.10.1 de 95%, utilizando o MAFFT v7.475 e arquivos de anotação GFF3 produzidos pelo Prokka v1.14.6 ⁷⁶. O genoma core foi definido como "genes presentes em, pelo menos, 99% dos genomas". Posteriormente, com base no alinhamento do genoma core definido pelo Roary, uma árvore filogenética baseada no método de Máxima Verossimilhança foi construída utilizando o programa IQ-TREE v. 2.0.3 ⁸⁷, utilizando o melhor modelo de substituição nucleotídica, de acordo com o Bayesian Information Criterion (BIC) inferido pela ferramenta ModelFinder ⁸⁸ implantada no programa IQ-TREE v. 2.0.3. A confiabilidade dos ramos foi verificada usando a combinação dos métodos Ultrafast Bootstrap (UFBoot) ⁸⁷. As árvores obtidas foram visualizadas na interface do Interactive Tree of Life (iTOL) v4 (<https://itol.embl.de/>) e TBtools V.1.113 ⁸⁹.

Visando a detecção de possíveis diferenças na estruturação genética entre os isolados de Kp-KPC de ambos os grupos, uma análise sobre a composição de todas as anotações no genoma dos isolados foi realizada utilizando o Scoary ⁹⁰, uma ferramenta de estatística voltada para estudos de associação genômica (GWAS). O Scoary realiza o teste exato de Fisher para identificar variantes significativamente associadas às características e, em seguida, incorpora à estrutura filogenética para procurar a variante causal mais provável. A análise do Scoary foi realizada com parâmetros padrão, e considerando o valor de $p < 0,01$ para estabelecer diferenças significativas entre anotações gênicas presentes em ambos os grupos.

Com a finalidade de obter maior confiança sobre a identidade dos determinantes genéticos, todas as anotações gênicas que contrastaram entre os grupos tiveram suas sequências analisadas e confirmadas com auxílio dos bancos de dados Uniprot (disponível em <https://www.uniprot.org/>) e InterPro (disponível em <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

3.10 Ensaio de virulência em *Galleria mellonella*

Com a finalidade de investigar a capacidade dos isolados de Kp-KPC de causar infecção, foram selecionados representantes de ONLYCOL e de COLINFEC para o teste de virulência em modelo *in vivo* de larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera:

Pyralidae). A seleção dos isolados para este ensaio foi definida da seguinte forma: aqueles pertencentes ao grupo COLINFEC que apresentaram genes potencialmente associados ao processo de infecção, de acordo com os resultados obtidos do Scoary, e aqueles pertencentes ao grupo ONLYCOL que não continham esses mesmos genes.

Os ensaios de virulência *in vivo* seguiram protocolo descrito ⁹¹, com algumas adaptações. Brevemente, as larvas de *G. mellonella* utilizadas foram mantidas em um sistema contínuo de produção, e alimentadas com dietas restritas à base de farelo de trigo, fubá, leite em pó, levedo de cerveja, mel e glicerol. Todo o experimento foi realizado com as larvas em seu último instar ⁹². Os isolados de Kp-KPC foram cultivados em caldo Brain Heart Infusion (BHI – OXOID) até uma OD₆₀₀ = 0,5. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}), e as diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram inoculadas em ágar BHI pela técnica de microgotas (20 µL) para a obtenção da unidade formadora de colônia por mililitros (UFC/mL). Em seguida, foram aplicados 10 µL de suspensão bacteriana na concentração de $6-7 \times 10^4$ (concentração final na larva) no penúltimo pseudópode da larva utilizando uma seringa SGE 25 µL (Trajan Scientific and Medical). A seguir, as larvas foram mantidas em estufa a 37 °C. As larvas foram monitoradas após 24, 48, 72 e 96 horas de infecção.

Ao todo, 10 larvas foram utilizadas para cada isolado de Kp-KPC testado. As larvas que não mostraram nenhum estímulo ao toque foram consideradas mortas. Um grupo de larvas foi preparado como controle negativo, em que 10 µL de PBS estéril foram injetados nas larvas ou invés de suspensão bacteriana, e monitoradas nas mesmas condições descritas anteriormente. Durante o período do experimento, três réplicas biológicas foram utilizadas.

Um segundo ensaio foi realizado em paralelo, com a finalidade de analisar a capacidade de Kp-KPC de causar infecção em *G. mellonella* em diferentes concentrações. Neste caso, as larvas foram infectadas com as concentrações $6-7 \times 10^2$, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 . O experimento foi realizado utilizando a mesma metodologia apresentada anteriormente, com exceção das diferentes concentrações aplicadas nas larvas.

As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier (teste log-rank) foram obtidas com auxílio do programa Graphpad – Prism V. 8.0.2, considerando o valor de $p < 0,05$ para estabelecer diferenças significativas entre os grupos e diferentes linhagens.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características dos pacientes e respectivos isolados Kp-KPC

Durante o período de 37 meses avaliados neste estudo, foram obtidos 446 isolados de Kp-RC. Destes, 374 (83,8%) foram positivos para *bla_{KPC}*. Os restantes 72 isolados foram, então, excluídos das etapas seguintes.

Os 374 isolados de Kp-KPC incluídos no estudo foram obtidos de 169 pacientes, representando, assim, 169 isolados (45,2%) recuperados a partir de cultura de vigilância, 104 (27,8%) de urina, 56 (15,0%) de lavado broncoalveolar, 27 (7,2%) de sangue, cinco (1,3%) de fragmento ósseo, três (0,8%) de tecidos moles, dois (0,5%) de líquido peritoneal, dois (0,5%) de líquido, dois (0,5%) de ferida cirúrgica, dois (0,5%) de secreção abdominal e dois (0,5%) de abscesso.

Em relação aos anos de 2018 e 2019, o número de isolados coletados em cada ano foi relativamente proporcional aos meses de estudo: média de 7 e 5,75 isolados de Kp-KPC por mês, respectivamente. Contudo, houve um aumento deste montante nos dois anos seguintes: média de 11,2 isolados por mês em 2020, e 19,2 em 2021 (**Tabela 1**). Vale ressaltar que estes dois últimos anos foram grandemente impactados pela pandemia de COVID-19, influenciando no número de internações nas unidades de saúde, e, possivelmente, culminando em um aumento na disseminação de Kp-KPC.

Durante a pandemia de COVID-19, os profissionais de saúde enfrentaram cargas de trabalho sem precedentes e aumentaram as preocupações com a segurança pessoal, dada a ameaça onipresente da transmissão nosocomial do vírus SARS-CoV-2 em ambientes clínicos⁹³. Estudos anteriores sugeriram que o aumento dos requisitos de equipamentos de proteção individual (EPI) durante a pandemia de COVID-19 pode ter resultado na redução da atenção às atividades rotineiras de prevenção e controle de IRAS, como cuidados com cateter central e cateter urinário. Em outras unidades hospitalares, o problema foi a escassez desses EPIS, que

deveriam ser utilizados em pacientes em precaução de contato para patógenos de preocupação para a saúde pública, mas que foram direcionados a pacientes com SARS-COV-2 ^{93,94}. Notavelmente, os sistemas de saúde foram impactados negativamente pela pandemia, e o efeito relacionado ao aumento das IRAS sobrecarregou ainda mais estes sistemas.

Tabela 1 - Prevalência de isolados Kp-KPC em diferentes amostras clínicas

Amostra Clínica	Número (%) de isolados Kp-KPC			
	2018 ^a	2019	2020	2021 ^b
Swab Anal	28 (50%)	30 (43.4%)	62 (46.2%)	49 (42.6%)
Urina	15 (26.7%)	20 (28.9%)	35 (26.1%)	34 (29.5%)
BAL ^c	10 (17.8%)	6 (8.6%)	17 (12.6%)	23 (20%)
Sangue	2 (3.5%)	8 (11.5%)	9 (6.7%)	8 (6.9%)
Outros	1 (1.7%)	5 (7.2%)	11 (8.2%)	1 (0.8%)
Total	56 (100%)	69 (100%)	134 (100%)	115 (100%)

^a Período referente a oito meses; ^b período referente a seis meses; ^c BAL, lavado broncoalveolar.

Considerando os dados demográficos e clínicos, a maioria dos 169 pacientes (61,9%) era do sexo masculino, e a idade média foi de 57,4 anos (mínimo de dois, e máximo de 93 anos). Cento e quinze (68,0%) indivíduos estavam na UTI quando a cultura de vigilância foi solicitada, 24 (14,2%) estavam em unidades de pronto atendimento, oito (4,7%) em unidade pós-operatória, oito (4,7%) em enfermarias, oito (4,7%) na enfermaria de transplante de células-tronco hematopoiéticas, três (1,8%) na unidade de oncologia, e dois (1,1%) na unidade de cuidados paliativos. O tempo médio decorrido entre a coleta do *swab* de vigilância e as coletas de amostras de sítio de infecção suspeita dos respectivos pacientes foi de 12 dias (mínimo de 0, e máximo de 77 dias), dentro de um intervalo de até 90 dias. Culturas de vigilância solicitadas após as suspeitas de infecção não foram consideradas neste estudo.

Além disso, a maioria dos pacientes necessitou de cuidados em UTI ou estava em unidades de alta complexidade de atendimento (transplante e oncologia), o que demonstra a gravidade do estado geral de saúde dos pacientes da coorte. Embora não tenhamos obtido informações mais aprofundadas sobre os prontuários dos 169

pacientes nessa etapa do estudo, a necessidade de atendimento nas referidas unidades indicam fatores de risco para colonização e infecção por Kp-KPC ¹³.

4.2 Perfil de suscetibilidade dos isolados de Kp-KPC obtidos de sítios de infecção

Em geral, os 205 isolados obtidos a partir de amostras de sítio corporal com suspeita de infecção apresentaram resistência a quase todos os antibióticos β -lactâmicos (incluindo penicilinas, cefalosporinas de 3^a e 4^a geração e carbapenêmicos), exceto ceftazidima-avibactam, à qual todos os isolados Kp-KPC foram sensíveis. Em relação às demais classes de antimicrobianos, foi observada alta frequência de resistência à ciprofloxacina (99,5%, 201/202) e à combinação sulfametoxazol/trimetoprima (89,6%, 95/106), e moderada frequência de resistência à gentamicina (59,7%, 120/201) e à polimixina B (52,7%, 105/199). Por outro lado, apenas 6,4% (13/202) dos isolados foram resistentes à amicacina, e 5,0% (1/20) à tigeciclina (**Figura 2**).

Os únicos antibióticos que apresentaram boa atividade contra os isolados de Kp-KPC *in vitro* foram a ceftazidima-avibactam, a amicacina e a tigeciclina. No entanto, é importante ressaltar que a ceftazidima-avibactam é um medicamento que não está disponível em todas as regiões e hospitais, devido ao seu alto custo ⁹⁵. Adicionalmente, amicacina e tigeciclina não são recomendados em monoterapia – exceto para infecções do trato urinário, onde os aminoglicosídeos são considerados eficientes ⁹⁶ –, devido ao relato de falhas no tratamento ou à fraca evidência de sucesso ^{96–98}.

Alternativamente, a polimixina B é conhecida como uma opção terapêutica para o tratamento de infecções causadas por Kp-KPC, embora seu uso seja controverso no cenário médico devido à sua alta toxicidade e à seleção de patógenos resistentes à droga ⁹⁹. Entretanto, a maioria dos isolados de Kp-KPC testados foi resistente a essa droga (**Figura 2**).

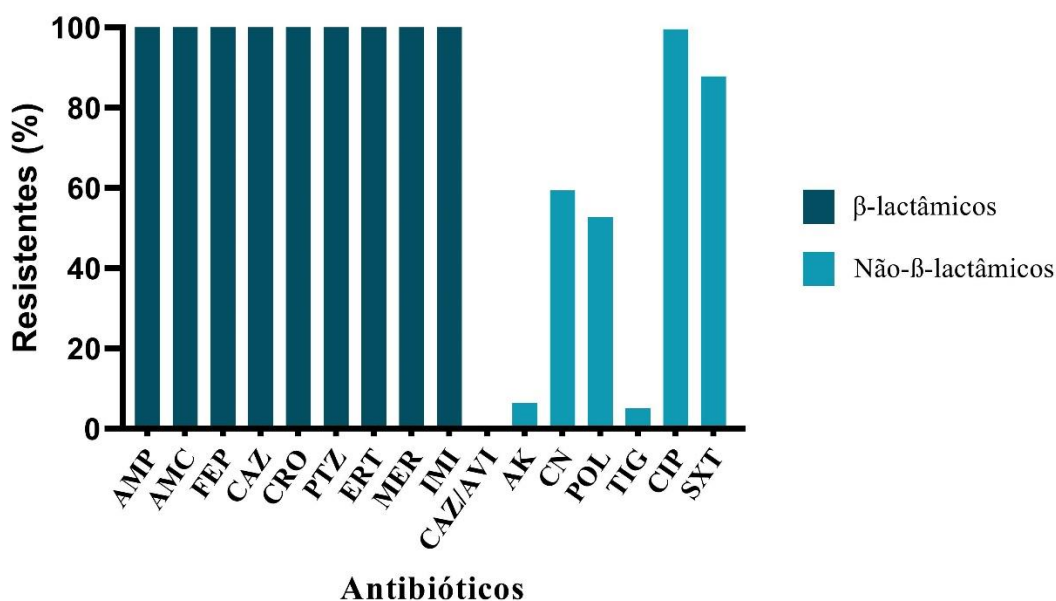


Figura 2: Perfil de suscetibilidade antimicrobiana de isolados Kp-KPC obtidos de sítios de infecções. AMP = ampicilina; AMC = amoxicilina/ácido clavulânico; FEP = cefepima; CAZ = ceftazidima; CRO = ceftriaxona; PTZ = piperacilina/tazobactam; ETP = ertapenem; MER = meropenem; IMI = imipenem; CAZ/AVI = ceftazidima/tazobactam; AK = amikacina; CN = gentamicina; POL = polimixina B; TIG = tigeciclina; CIP = ciprofloxacina; SXT = sulfametoxazol/trimetoprima.

4.3 Tipagem molecular e disposição de Kp-KPC em ONLYCOL ou COLINFEC

As análises de *Xba*I-PFGE revelaram uma ampla diversidade genética entre os isolados de Kp-KPC estudados; no entanto, vários obtidos de diferentes pacientes agruparam-se com alta similaridade genética (**Apêndice A**). Assim, os 374 isolados de Kp-KPC foram distribuídos em 73 grupos, alguns deles contendo numerosos membros (de oito a 22 representantes). Também foi possível observar agrupamentos formados por Kp-KPC obtidos de diferentes pacientes durante todo o período do estudo, incluindo amostras de cultura de vigilância e de sítios de infecção. Embora a maioria dos isolados de Kp-KPC que se agruparam tenha sido obtida de pacientes de UTI, alguns foram coletados de pacientes internados em outras unidades.

Um fato importante a ser destacado é a presença de diversos isolados Kp-KPC obtidos de diferentes pacientes com anos de diferença entre as amostragens, porém agrupando-se com alta similaridade. Um exemplo disso é o isolado CV28, obtido de uma amostra de *swab* anal do paciente 10, internado em UTI em maio de 2018, que apresentou similaridade genética de 93,8% com o isolado Kp-KPC 677/21, obtido de

uma amostra de urina do paciente 192, internado em UTI em maio de 2021 (**Apêndice A**). Dessa forma, o isolado que colonizou o paciente 10 era muito semelhante àquele que causou um episódio de infecção três anos depois no paciente 192. Não podemos garantir que estes pacientes nunca tiveram qualquer tipo de contato próximo, bem como, o presente estudo não foi desenhado para responder esse tipo de questão. Entretanto, este fato sugere que as linhagens de Kp-KPC que adentram instituições de saúde podem representar um risco para os pacientes, uma vez que permanecem viáveis naquele ambiente de assistência por longos períodos e, assim, podem ser responsáveis por infecções nosocomiais em outros pacientes.

Adicionalmente, 84 (49,7%) dos 169 isolados de Kp-KPC obtidos de cultura de vigilância agruparam com similaridade genética com, pelo menos, um isolado obtido de um sítio de infecção do mesmo ou de outro paciente (**Apêndice A**). Dentre estes, somente 32,1% (27/84) apresentaram alta similaridade com um isolado de Kp-KPC obtido a partir de um local de infecção no mesmo paciente. Estes foram considerados como cepas colonizantes e infectantes de um mesmo paciente. Por outro lado, 24 (14,2%) dentre os 169 isolados obtidos de cultura de vigilância apresentaram similaridade genética inferior a 80% com qualquer outro recuperado de um sítio de infecção de qualquer paciente. Considerando a população amostrada no presente estudo, esses 24 isolados foram considerados evolutivamente distantes de quaisquer outros isolados de Kp-KPC obtidos de sítio de infecção de qualquer paciente (**Apêndice A**), demonstrando que não foram capazes de causar infecção.

Assim sendo, 51 (30,2%) isolados de Kp-KPC, dentre os 169 obtidos de cultura de vigilância, cumpriram estritamente os critérios estabelecidos para serem agrupados em ONLYCOL ou COLINFEC. O grupo ONLYCOL foi composto pelos 24 isolados de Kp-KPC que somente colonizaram pacientes (similaridade genética $< 80\%$ com qualquer outro isolado proveniente de sítio de infecção), e o grupo COLINFEC, pelos 27 isolados que colonizaram e, subsequentemente, causaram infecção (similaridade genética $\geq 90\%$ entre o isolado da cultura de vigilância e o do sítio de infecção de um mesmo paciente). Esses 51 isolados foram, a seguir, profundamente estudados com a finalidade de melhor compreender as características fenotípicas e genotípicas associadas ao processo de patogenicidade de Kp-KPC obtidos de cultura de vigilância que parecem colonizar e, posteriormente, participar de um processo infeccioso.

4.4 Dados clínicos e demográficos de pacientes respectivos aos isolados dos grupos ONLYCOL e COLINFEC

Os 51 pacientes referentes aos 24 isolados de ONLYCOL e aos 27 isolados de COLINFEC tiveram seus prontuários médicos avaliados com maior profundidade. Com base nas características clínicas e demográficas dos pacientes, nenhum fator de risco apresentou diferença estatística significativa entre os dois grupos estudados, exceto para o nível sanguíneo de plaquetas contabilizadas próximo ao período de coleta de amostras de sítios de infecção ($p = 0,016$). Os pacientes cujo isolado de Kp-KPC foi incluído no grupo ONLYCOL apresentaram, como média, 306.000 plaquetas/ μL no momento da infecção por outra cepa de *K. pneumoniae*, enquanto o valor médio daqueles do grupo COLINFEC foi de 216.000/ μL (**Tabela 2**).

As plaquetas são células sanguíneas importantes, pois, além de serem responsáveis pela coagulação do sangue, apresentam funções inflamatórias que ajudam a modular a resposta imunológica durante doenças infecciosas ¹⁰⁰. Isso ocorre porque as plaquetas possuem receptores imunológicos que lhes permitem atuar como sentinelas no reconhecimento e ativação de células do sistema imune contra patógenos ¹⁰¹. Apesar de termos relatado diferenças nas concentrações sanguíneas de plaquetas entre os grupos, acreditamos que esses valores não são clinicamente relevantes uma vez que os valores obtidos para ambos os grupos ainda foram considerados dentro da normalidade, de 140.000/ μL a 350.000/ μL ¹⁰².

Tabela 2: Dados clínicos e demográficos dos pacientes.

Características	Grupos		Total (N = 51)	p-valor
	ONLYCOL (N = 24)	COLINFEC (N = 27)		
Idade média	59	60	-	0,805
Sexo				
Masculino	16 (66,7%)	15 (55,6%)	31 (60,7%)	0,417
Feminino	8 (33,3%)	12 (44,4%)	20 (39,3%)	
Raça				
Branco	19 (79,2%)	25 (92,6%)	44 (87,3%)	0,232
Não branco	5 (20,8%)	2 (7,4%)	7 (13,7%)	
Comorbidades	23 (95,8%)	26 (96,3%)	49 (96%)	1
Internação prévia em UTI^a	17 (70,8%)	21 (77,8%)	38 (74,5%)	0,57
Óbito	14 (58,3%)	15 (55,6%)	29 (56%)	0,82
Uso prévio de CVD^a	16 (69,6%)	22 (81,5%)	38 (74,5)	0,325
Uso prévio de NPP^a	0	1 (3,7%)	1 (1,9%)	1
Hemodiálise^a	7 (29,2%)	10 (37%)	17 (33,3%)	0,48
Uso prévio de inotrópico^a	14 (58,3%)	20 (74,1%)	34 (66,6%)	0,318
Uso prévio de VMI^a	23 (95,8%)	25 (92,6%)	48 (94,1%)	1
Uso prévio de β-lactâmicos^b	10 (40,7%)	11 (41,7%)	21 (41,17)	0,947

Tabela 2 (continuação): Dados clínicos e demográficos dos pacientes.

Características	Grupos		Total (N = 51)	p-valor
	ONLYCOL (N = 24)	COLINFEC (N = 27)		
PCR ^c				
Colonização	13,23	10,14	-	0,324
Infecção	12,43	18,02	-	0,065
Creatinina ^c			-	
Colonização	2,2	2,6		0,50
Infecção	2,35	2,18		0,65
Plaquetas ^c			-	
Colonização	294000	224000		0,097
Infecção	216000	306000	-	0,016*
Leucócitos ^c			-	
Colonização	12820	13396		0,794
Infecção	12710	17758	-	0,256
Hemoglobina ^c				
Colonização	9,43	9,37	-	0,92
Infecção	9,15	8,8	-	0,523

^a Uso/permanência prévia durante o período em que foi coletado as amostras (30 dias); ^b uso prévio nos últimos 30 dias; ^c valor médio referente a 48 horas antes ou depois das coletas das amostras de cultura de vigilância e de sítios clínicos; *: diferença significativa considerando o valor de $p < 0,05$. UTI: unidade de terapia intensiva; CVD: cateter vesical de demora; NPP: Nutrição parenteral periférica; VMI: Ventilação mecânica invasiva; PCR: Proteína C reativa.

Inúmeros fatores de riscos são descritos como associados à infecção por Kp-KPC em pacientes previamente colonizados ¹⁷. Dentre eles, está o uso prévio de antibióticos considerados de alto risco, tais como os carbapenêmicos. Neste estudo, 10 (41,7%) pacientes do grupo ONLYCOL fizeram o uso prévio de algum β -lactâmico, sendo que 9 utilizaram o carbapenêmico meropenem, enquanto no grupo COLINFEC, 11 (40,7%) fizeram o uso de algum β -lactâmico, dos quais 10 foi o meropenem. Quase todos os pacientes de cada grupo (96,0% para ambos) apresentaram condição de

saúde crítica devido à presença de comorbidade, de dispositivos invasivos, e de infecção por Kp-KPC, o que pode ter impactado significativamente na ocorrência de óbitos (**Apêndices B-D**). Dentre as principais comorbidades relatadas, destacaram-se hipertensão arterial, diabetes mellitus, obesidade e o diagnóstico de alguma cardiopatia (**Apêndice B**).

A internação prévia em UTI ocorreu na maioria dos pacientes de ambos os grupos, sendo 17 (70,8%) no grupo ONLYCOL e 21 (77,8%) no grupo COLINFEC. Consistentemente com outros estudos que avaliaram os fatores de risco associados à colonização e infecção por *K. pneumoniae*^{14,48,53,103}, o uso de dispositivos invasivos, tais como CVC, CVD e VMI, bem como a realização de hemodiálise, foram amplamente observados entre os pacientes do nosso estudo, com exceção de NPP.

Todos esses resultados enfatizam a semelhança na condição de saúde dos pacientes de ambos os grupos, o que rejeita a ideia de que os fatores relacionados ao paciente e ao seu cuidado possam ter favorecido o processo de evolução da doença pela mesma cepa de Kp-KPC que colonizava pacientes do grupo COLINFEC. Assim, diferenças importantes sobre os aspectos clínicos entre os pacientes foram consideradas irrelevantes, de modo que fatores associados aos isolados bacterianos puderam ser mais bem explorados na busca por um sentido microbiológico para a relação colonização/infecção.

4.5 Fenótipos de resistência e de virulência

Todos os 51 isolados incluídos nos grupos ONLYCOL ou COLINFEC foram considerados MDR, apresentando resistência à maioria dos antibióticos testados, com exceção da polimixina B, à qual apenas 10 (19,6%) apresentaram resistência, sendo 2 (8,3%, 2/24) do grupo ONLYCOL e 8 (29,6%, 8/27) do grupo COLINFEC. No entanto, não foi possível estabelecer diferença significativa com relação ao perfil de resistência aos antimicrobianos entre os dois grupos (**Tabela 3**).

Tabela 3: Número e frequência (%) de resistência dos isolados de Kp-KPC obtidos de ambos os grupos de estudo.

Classe /Antibiótico	Número (%) de isolados resistentes			p-valor
	ONLYCOL	COLINFEC	Total	
β-Lactâmicos				
Amoxicilina/clavulanato	24 (100%)	27 (100%)	51 (100%)	-
Cefoxitina	24 (100%)	27 (100%)	51 (100%)	-
Ceftriaxona	24 (100%)	27 (100%)	51 (100%)	-
Cefepime	24 (100%)	27 (100%)	51 (100%)	-
Ertapenem	24 (100%)	27 (100%)	51 (100%)	-
Piperacilina/Tazobactam	24 (100%)	27 (100%)	51 (100%)	-
Aminoglicosídeos				
Amicacina	11 (45,8%)	11 (40,7%)	22 (43,13%)	0,25
Gentamicina	20 (83,3%)	22 (81,4%)	42 (82,35%)	0,35
Fluoroquinolonas				
Ciprofloxacina	22 (91,6%)	27 (100%)	49 (96%)	0,46
Fenicóis				
Cloranfenicol	22 (91,6%)	22 (85,1%)	44 (88,2%)	0,29
Tetraciclinas				
Tetraciclina	21 (87,5%)	22 (81,4%)	43 (86,2%)	0,34
Agentes diversos				
Polimixina B	2 (8,3%)	8 (29,6%)	10 (19,6%)	0,055
Sulfametoxazol/Trimetoprima	20 (83,3%)	26 (96,2%)	46 (86,2%)	0,28

A alta frequência de multirresistência observada se deve ao fato de que os isolados do estudo são produtores de carbapenemase do tipo KPC, e, de maneira consistente, a antibioticoterapia de alto risco recebida pelos pacientes anteriormente à coleta da cultura de vigilância pode estar relacionada à seleção e disseminação desses patógenos nas diferentes unidades hospitalares. De fato, mais da metade dos pacientes (64,7%) fizeram o uso de carbapenêmicos (imipenem e meropenem) e de polimixina B ou E (66,6%) no período citado (**Apêndice B**).

A capacidade de formação de biofilme dos 51 isolados de Kp-KPC foi investigada, e a maioria deles (82,3%) apresentou o fenótipo de produção de biofilme. Embora o grupo ONLYCOL tenha demonstrado mais representantes com produção moderada e forte em relação ao grupo COLINFEC, esses valores não foram estatisticamente significativos (**Tabela 4**).

Tabela 4:Produção de biofilme por isolados de Kp-KPC obtidos de ambos os grupos

Produção de biofilme	ONLYCOL	COLINFEC	p-valor
Ausente	4	5	0,999
Fraco	8	14	0,21
Moderado	8	5	0,508
Forte	4	3	0,999

O biofilme é uma agregação de microrganismos em uma substância autoproduzida, fixada permanentemente em superfícies bióticas ou abióticas, que permite a eles sobreviverem em diferentes ambientes, até mesmo em instrumentos e equipamentos médicos ^{104,105}. Diante disso, uma maior ocorrência de IRAS pode ser devido à habilidade de formação de biofilme em dispositivos invasivos ¹⁰⁵. A capacidade de produção de biofilme pelos isolados de Kp-KPC observada neste estudo pode estar associada às IRAS, uma vez que quase todos os pacientes pertencentes a ambos os grupos (92,5% de COLINFEC e 95,8% de ONLYCOL) fizeram o uso de algum dispositivo invasivo (**Tabela 2**).

Apesar de não ter sido realizado o teste de produção de biofilme em todos os 374 isolados de Kp-KPC do nosso estudo, esta característica pode estar associada à permanência desses patógenos em diferentes unidades de saúde ao longo do período do estudo, como discutido anteriormente, na seção de tipagem molecular por *Xba*I-PFGE (**seção 4.3**).

Adicionalmente ao teste de biofilme, as colônias dos isolados de Kp-KPC foram avaliadas quanto à característica de hipermucoviscosidade. Diferentes morfologias foram observadas entre as colônias de ambos os grupos (dados não mostrados); entretanto, nenhuma apresentou este fenótipo de virulência.

Com base nas análises fenotípicas do estudo, não foi possível estabelecer diferenças evidentes entre os representantes de ambos os grupos, tanto para o perfil de suscetibilidade aos antibióticos quanto para a capacidade de formação de biofilme. Assim, uma análise completa sobre o conteúdo genético de cada um dos isolados pertencentes aos grupos poderia auxiliar na elucidação dos motivos que diferenciam os isolados que colonizam e causam infecção (COLINFEC) daqueles que somente colonizam (ONLYCOL).

4.6 Análise genética a partir do sequenciamento completo do genoma

Para melhor compreender os determinantes genéticos associados ao processo de patogenicidade, os isolados de ambos os grupos foram submetidos ao WGS. Os genomas montados foram considerados de boa qualidade, com número médio de 151 *contigs*, com intervalo de 43 a 666 *contigs* (**Figura 3a**); a média do N50 foi 156.488,7, com intervalo de 32.049 a 370.124 (**Figura 3b**); o tamanho médio dos genomas foi de 5,6 Mb, variando de 4,8 Mb a 6,1 Mb (**Figura 3c**); e a contagem de sequências codificadoras (CDS) teve, como média, o valor de 5.399, variando entre 4.901 e 5826 CDS (**Figura 3d**). Outros parâmetros referentes à técnica e à montagem dos genomas também estão disponibilizados no **Apêndice E**. Assim sendo, a qualidade do sequenciamento dos isolados de ambos os grupos foi semelhante, não havendo diferença significativa entre eles, o que permite maior confiabilidade na equiparação das análises subsequentes entre os grupos ONLYCOL e COLINFEC.

Com a finalidade de determinar a similaridade entre os 51 isolados de Kp-KPC, uma árvore filogenética de máxima verossimilhança foi construída a partir do alinhamento do genoma core de cada um dos isolados. Oito diferentes STs foram relatadas, com maior ocorrência de ST 11, ST 16 e ST 340. Em relação ao polissacarídeo capsular, também foram observados oito diferentes alelos do gene *wzi*, com maior ocorrência de *wzi*64 e *wzi*50 (**Figura 4**).

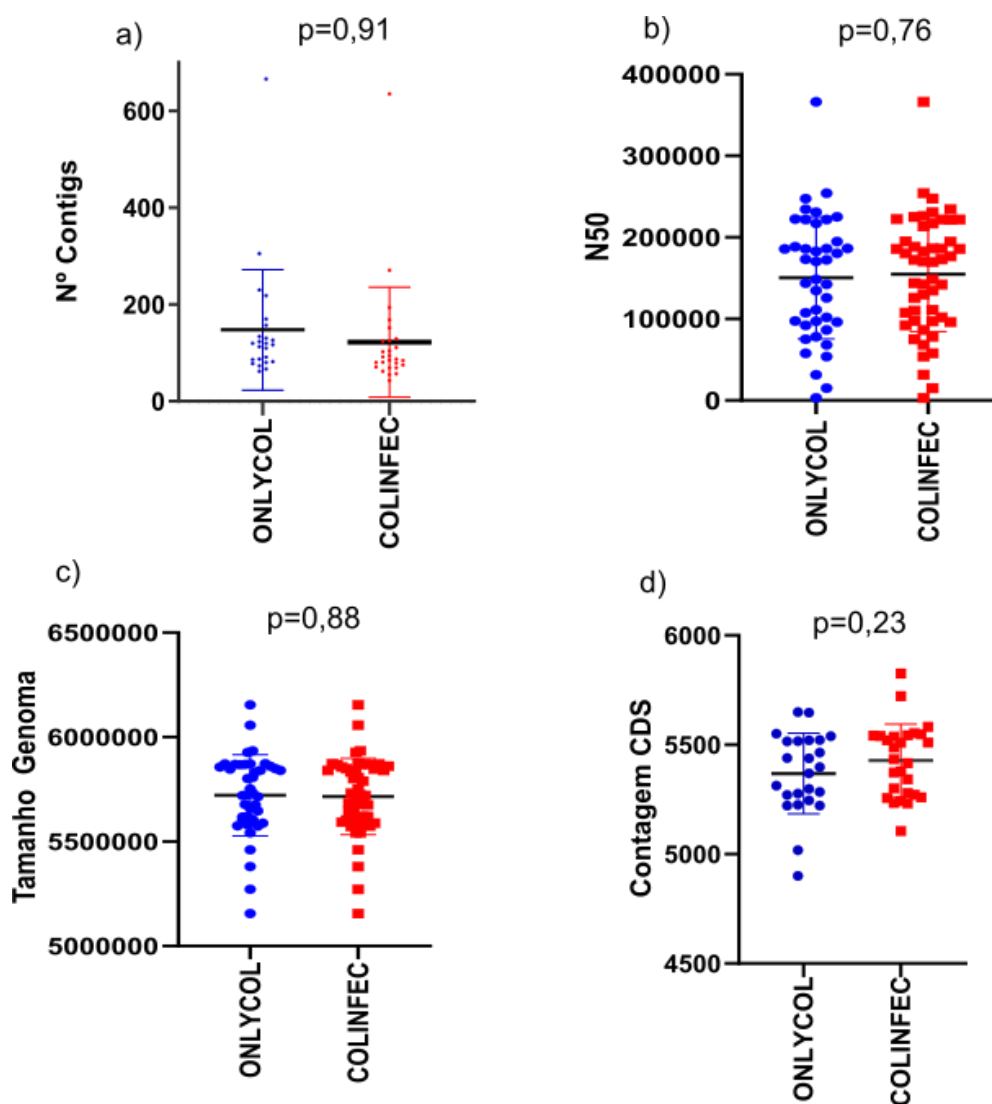


Figura 3. Parâmetros da montagem do genoma dos Isolados de Kp-KPC. **a)** Comparação do número de *contigs* para montagens do genoma de Kp-KPC entre ONLYCOL (n = 24) e COLINFEC (n = 27), média exibida, teste t de Student bilateral. **b)** Comparação do comprimento N50 para montagens do genoma de de Kp-KPC entre ONLYCOL (n = 24) e COLINFEC (n = 27), média exibida, teste t de Student bilateral. **c)** Comparação do comprimento do genoma de Kp-KPC entre ONLYCOL (n = 24) e COLINFEC (n = 27), teste t de Student bilateral). **d)** Comparação do número de sequências de codificação (CDS) para conjuntos do genoma de de Kp-KPC entre ONLYCOL (n = 24) e COLINFEC (n = 27), média exibida, teste t de Student bilateral. Para a-d, cada ponto de dados representa uma única montagem do genoma de Kp-KPC.

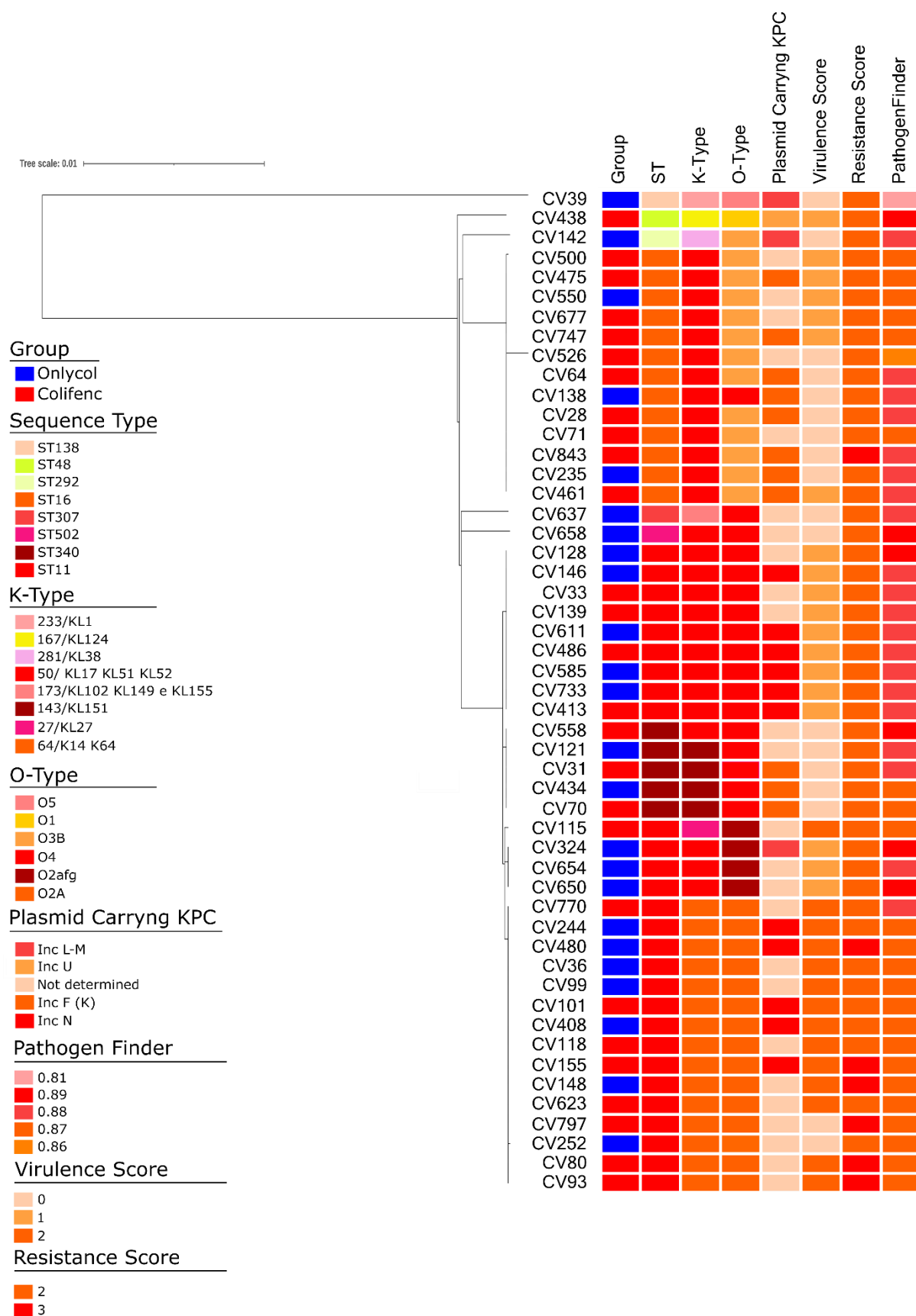


Figura 4: Árvore filogenética das 51 Kp-KPC pertencentes a ambos os grupos. Árvore baseada em máxima verossimilhança construída a partir do genoma core definidos pelo programa Roary.

Considerando os 51 genomas analisados, a investigação do lipopolissacarídeo O (O-type) foi realizada, e seis antígenos diferentes foram encontrados, sendo as variantes O4 (n = 17, 33,3%), O2B (n = 15, 29,4%) e O3B (n = 13, 25,4%) com maior representatividade entre os isolados de Kp-KPC. Com relação aos replicons dos plasmídeos carreando o gene *bla_{KPC-2}*, somente em 26 genomas foi possível identificar a ocorrência de quatro replicons: IncF_K, IncN, IncL-M e IncU. Dentre estes, o IncF_K (n = 11, 42,3%) e o IncN (n = 11, 42,3%) tiveram maior representatividade. Adicionalmente, com base na pontuação gerada pelo Kleborate, dentre todos os Kp-KPC, 14 (27,4%) isolados apresentaram o *score* de virulência 2, e 19 (37,2%) apresentaram o *score* 1. Em relação ao *score* de resistência, sete (13,7%) apresentaram *score* 3, e o restante (86,2%), *score* 2. Por fim, todos os 51 isolados apresentaram alta probabilidade de ser um patógeno humano (> 0,8) (**Figura 4**).

De maneira geral, foi possível observar uma clara distinção entre as linhagens identificadas como pertencentes ao CC 258 (ST 11 e ST 340) e ST 16 em relação às demais. As linhagens do CC 258 foram amplamente distribuídas entre os grupos, sendo encontradas tanto em ONLYCOL (n = 17) quanto em COLINFEC (n = 16). No entanto, a ST 16 foi significativamente associada ao grupo COLINFEC (n = 10, p = 0,043), e, de forma semelhante, entre os antígenos O, somente o antígeno O3B também se mostrou associado ao grupo COLINFEC (n = 10, p = 0,043). Por outro lado, não foi estabelecida diferença significativa entre os grupos em relação ao polissacarídeo capsular, *scores* de virulência e resistência, e quanto à probabilidade de ser um patógeno.

Assim como as linhagens do CC 258, principalmente, ST 11 e ST 340, o clone ST 16 também é considerado clinicamente importante, e está igualmente associado ao perfil MDR¹⁰⁶. Desde o ano de 2008, ocorreram inúmeros relatos sobre o aumento da ocorrência de ST 16 carreando múltiplas carbapenemases, e, a partir disso, este clone se tornou preocupante para a saúde pública¹⁰⁷. O CC 258 ainda é o principal relacionado às IRAS; entretanto, há relatos de maior frequência de óbitos atribuídos ao clone ST 16, apesar de não existir uma definição clara que justifique este fato⁴⁵. No presente estudo, relatamos a prevalência de representantes do CC 258 entre os isolados ONLYCOL e COLINFEC, enquanto representantes de ST 16-O3b foram associados, estatisticamente, somente ao grupo COLINFEC. Dessa forma, as

diferenças entre a composição genômica dessas linhagens serão melhor exploradas adiante.

A caracterização dos antígenos CPS e LPS-O é um elemento-chave na busca da compreensão da patogenicidade de *K. pneumoniae* ^{108,109}. Nossos resultados mostraram uma maior variabilidade de antígenos associado à ST 11 (alelos *wzi*50, *wzi*64 e *wzi*75), de modo similar ao observado em outros estudos ^{8,45,47,58}, enquanto que a ST 16 foi associada somente ao alelo *wzi*50. A diversidade de antígenos observada nos isolados ST 11 se deve a um *hotspot* de recombinação no *locus* de biossíntese, e o mesmo não é observado em isolados ST 16 ¹¹⁰. Tal fato explica o motivo de uma menor variabilidade genética ser observada nessas linhagens, com predomínio do sorotipo ST 16-KL51.

Os *scores* de resistência e virulência gerados pelo Kleborate não mostraram variações entre os grupos, evidenciando determinantes importantes tanto no grupo ONLYCOL quanto no COLINFEC. No entanto, ao analisar separadamente as duas principais ST identificadas no estudo (ST 11 e ST 16), foi possível observar maior frequência do *score* de resistência para algumas cepas ST 11 em comparação ST 16, o mesmo também sendo observado para o *score* de virulência. Este contraste observado entre as frequências nos *scores* está relacionado com o sorotipo ST 11-O2a-KL64, onde os maiores *scores* foram atribuídos a este sorotipo em relação aos demais clones ST 11 relatados neste estudo.

Dentre os sorotipos associados ao ST 11, o KL64 tem sido amplamente associado ao perfil de hipervirulência, devido aos genes que essas linhagens carregam ^{58,110,111}. Resultados similares, onde o maior *score* de resistência e virulência do Kleborate são atribuídos a algumas cepas ST 11 em comparação à ST 16, foram recentemente relatados ^{18,48}. Entretanto, de um modo geral, ambas as linhagens apresentam mecanismos de resistência e virulência igualmente importantes, que ameaçam os sistemas de saúde ⁴³. Considerando o êxito global de ST 11 e as semelhanças com ST 16 relacionadas à virulência e à resistência, esta última linhagem emergente demonstra o potencial de se tornar um clone epidêmico global e representar uma grande ameaça à saúde pública ⁴⁸.

Outro fator que evidenciou uma possível relação com o grupo de isolados que causaram infecção foi o replicon IncF_K carreando o gene *bla*_{KPC-2}. Foi possível estabelecer o plasmídeo carreador de *bla*_{KPC-2} em 56,8% (16 COLNFEC e 13 ONLYCOL) dos isolados sequenciados. Dentre esses, o IncF_K esteve presente em 68,7% (11/16) dos isolados do grupo COLINFEC e somente em 23,1% (3/13) do grupo ONLYCOL ($p = 0,021$). Por outro lado, o replicon IncN carreando o gene *bla*_{KPC-2} teve maior ocorrência no grupo ONLYCOL (7/13, 53,8%) se comparado ao grupo COLINFEC (4/16, 25,0%), e o replicon IncL/M somente foi detectado nos isolados do grupo ONLYCOL (3/13, 23,1%); entretanto, nenhum desses ocorreu com diferença significativa entre os grupos.

Adicionalmente, o replicon IncF_K carreando *bla*_{KPC-2} teve relação direta com os isolados de Kp-KPC ST 16, pois, em todos os representantes desta linhagem ao qual foi possível identificar o plasmídeo, o gene era carreado por este tipo de plasmídeo. Entretanto, não foi possível estabelecer o plasmídeo que estava carreando *bla*_{KPC-2} em 43,2 % (22/51) dos isolados. Tal fato, pode ter ocorrido devido à limitação da técnica de sequenciamento por *short reads*, o que resultou em um genoma fragmentado, e, assim, inviabilizando a associação do replicon com o gene. A interpretação desses resultados deve ser feita com cautela. Além disso, análises complementares devem ser realizadas para melhor compreender a estrutura da composição gênica desses plasmídeos e o seu papel no processo de patogenicidade.

A partir dos *scaffolds* originados da montagem *de novo* dos genomas, uma análise dos conteúdos gênicos presentes no resistoma, no viruloma, no plasmidoma e no mobiloma dos isolados de Kp-KPC pertencentes a ambos os grupos foi realizada. De acordo com as ferramentas ResFinder e Kleborate, 49 genes ou alelos associados à resistência aos antibióticos foram detectados conferindo resistência aos β -lactâmicos, a aminoglicosídeos, a sulfonamidas, à trimetoprima, à fosfomicina, a fluoroquinolonas, a tetraciclina, a macrolídeos, a lincosamidas e a estreptograminas. Consistentemente, os determinantes gênicos associados à resistência mostraram relação direta com o perfil fenotípico de resistência observado nos isolados. Além disso, esses genes foram amplamente distribuídos entre os grupos, não havendo diferença significativa. Dentre os genes de maior relevância clínica, tais como os que conferem resistência aos β -lactâmicos, a variante do gene *bla*_{KPC-2} foi confirmada em todos os 51 isolados, seguida por *bla*_{CTX-M-15}, detectado em 31 (60,8%) isolados (12

ONLYCOL e 19 COLINFEC) (**Figura 5**). Os genes que codificam o gene *mcr* e suas variantes não foram detectados. De acordo com o Kleborate, a resistência à polimixina B nos isolados Kp-KPC foi atribuída às alterações do gene *mgrB* ocasionada por mutações, resultando em uma proteína defeituosa que afeta a cascata de reações associada ao sistema de 2 componentes (PhoP/Q). Alterações na regulação deste sistema estão relacionadas diretamente com a resistência às polimixinas na família Enterobacteriaceae ¹¹².

Nossos resultados foram consistentes com relatos prévios sobre a ocorrência de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase em nossa unidade hospitalar, incluindo a ala pediátrica, onde a variante *bla*_{KPC-2} também foi a única variante detectada entre isolados obtidos de sítios clínicos e de cultura de vigilância ^{28,47}. Resultados similares também foram observados em outros hospitais de referência em nosso país ^{45,113-115}. Além disso, o gene *bla*_{KPC} está comumente associado a genes de resistência a outras drogas, tais como aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina e polimixinas ¹¹⁶⁻¹¹⁸. Este fato impacta diretamente na condição de saúde do paciente, pois limita as opções terapêuticas. A relação desses genes de resistência ocorre, principalmente, pela pressão seletiva do ambiente hospitalar e pela presença de elementos genéticos móveis que medeiam sua disseminação ¹¹⁹.

Em relação aos genes associados à virulência, 129 determinantes gênicos foram identificados entre os isolados pertencentes tanto a ONLYCOL quanto a COLINFEC, porém, sem diferença significativa. Todos os 51 isolados apresentaram genes que codificam fímbrias dos tipos 1 (*fim*) e 3 (*mrk*), os sideróforos enterobactina (*ent*) e salmoquelina (*iro*), e a bomba de efluxo AcrAB. Por outro lado, não foi detectado qualquer gene conhecidamente associado ao perfil de hipermucoviscosidade (principalmente, *magA* e *rmpA*) (**Figura 6**), que confere característica mucoide às colônias. Além disso, isolados de ambos os grupos apresentaram genes associados à produção do sideróforo yersiniabactina (16 de ONLYCOL e 17 de COLINFEC) e da toxina colibactina (7 de ONLYCOL e 9 de COLINFEC).

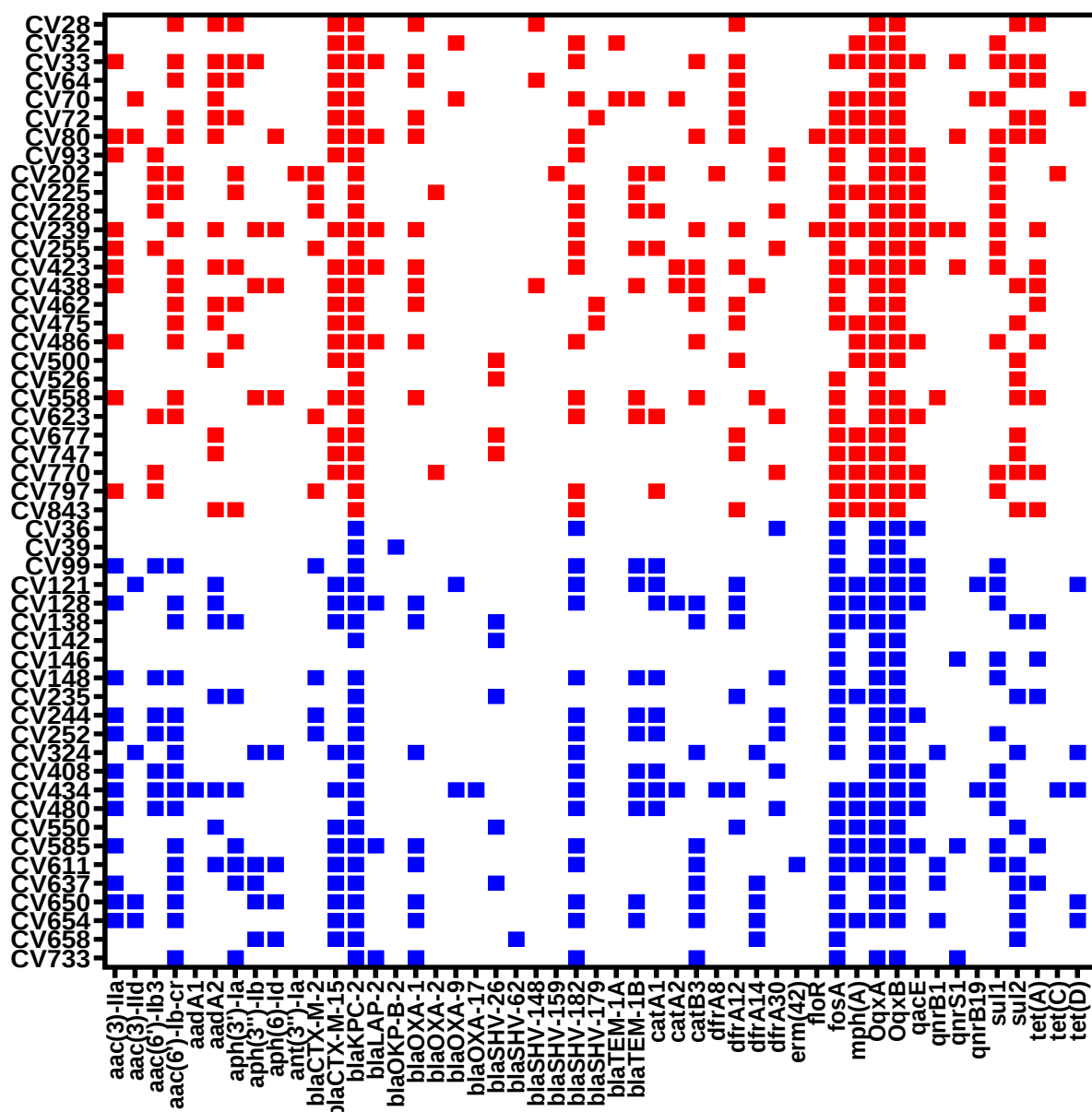


Figura 5: Genes de resistência detectados no genoma de 51 Kp-KPC. Quadrados preenchidos: presença do gene; em branco: ausência dos genes. Quadrados azuis representam os isolados pertencentes ao grupo ONLYCOL, e quadrados vermelhos, ao grupo COLINFEC.

A yersiniabactina atua ativamente na captação de ferro, metal que exerce papel fundamental como cofator para a cadeia de transporte de elétrons e para várias outras enzimas¹²⁰. Durante o processo de patogenicidade, a captação de ferro a partir de proteínas de transporte do hospedeiro é uma etapa crucial para o sucesso do patógeno. Além disso, o *locus* gênico *ybt*, que codifica a yersiniabactina, é conhecido por sua associação às IRAS, estando presente em 30,0-40,0% dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* e em 13% dos isolados que colonizam^{41,58}. De modo contrastante,

em nosso estudo, foi observada maior frequência de *ybt* tanto no grupo COLINFEC (62,9%) quanto no grupo ONLYCOL (66,6%). Esses resultados são alarmantes, uma vez que esses genes são considerados indicadores de cepas hipervirulentas, estando presente em 78,0% a 100% dos clones hipervirulentos descritos no mundo ⁵⁸.

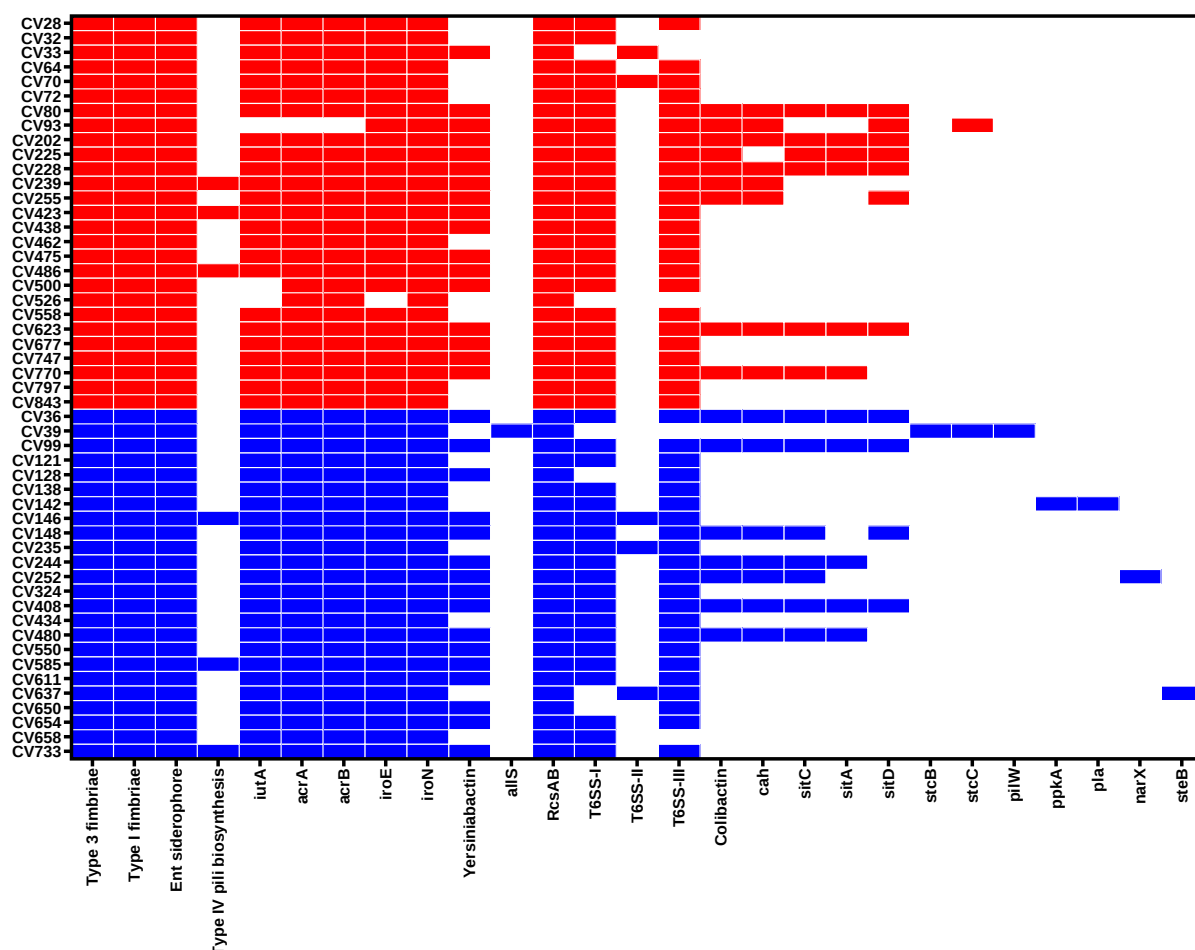


Figura 6: Viruloma dos 51 isolados de Kp-KPC. Quadrados preenchidos: presença do gene/locus de virulência; em branco: ausência do gene/locus. Quadrados azuis representam os isolados pertencentes ao grupo ONLYCOL, e quadrados vermelhos, ao grupo COLINFEC.

Outro *locus* importante associado ao processo de hipervirulência, que apresentou distribuição equilibrada entre os grupos (29,0% de ONLYCOL e 33,0% de COLINFEC), foi o *clb*. A toxina Clb induz danos ao DNA de células eucarióticas e é encontrada em, aproximadamente, 10,0% dos isolados de *K. pneumoniae*, normalmente associada à ICEKp10 ^{18,121}. Em *K. pneumoniae*, a colibactina está, principalmente, associada aos clones de abscesso hepático CC 66 e CC 23. No

entanto, há relatos sobre a presença de *clb* em linhagens MDR, como é o caso da linhagem ST 11-KL64 ¹⁸. A convergência desses determinantes de hipervirulência e multirresistência se dá pela presença, manutenção e disseminação de elementos genéticos móveis, como ICEs, transposons e plasmídeos, que compartilham estes genes entre diferentes linhagens de *K. pneumoniae* clássicas e hipervirulentas ⁸.

Com a genômica comparativa, é viável analisar as variações dos alelos gênicos, o que possibilita a investigação das variantes estruturais desses genes e dos elementos que os mobilizam ⁵⁸. Por meio de uma abordagem semelhante ao MLST, torna-se factível determinar a sequência tipo de yersiniabactina (YbST) com base nos diferentes alelos dos 11 genes do *locus ybt* ¹⁸. Da mesma forma, as variações no *locus clb* permitem definir as sequências tipo (CbSTs) e, a partir disso, estabelecer relações com as YbSTs e as estruturas que as carregam ¹²².

Neste contexto, diferentes variantes de yersiniabactina foram relatadas no presente estudo: *ybt0* (YbST 346), *ybt9* (YbST 183), *ybt10* (YbST 26), *ybt14* (YbST 132) e *ybt17* (YbST 269). O *ybt0* foi relacionado somente ao sorotipo ST 11-KL64, o *ybt17*, ao sorotipo ST 11-KL27, o *ybt10*, ao ST 11-KL105, e o *ybt9*, aos sorotipos ST 11-KL15 e ST 16-KL15. Além desses, o *ybt14* foi detectado, exclusivamente, em apenas um isolado do nosso estudo (ST 48-KL124). O *locus* de colibactina *clb3* foi o único detectado entre os isolados do estudo. No entanto, para essa mesma variante, quatro diferentes CbST foram encontrados (CbST 13-7LV, CbST 17-1LV, CbST 17-2LV e CbST 19-1LV), estando associada à ICEKp10.

As cinco diferentes variantes de yersiniabactina (*ybt0*, *ybt9*, *ybt10*, *ybt14* e *ybt17*) estiveram incorporadas em diferentes ICEs: ICEKp10 (*ybt0* e *ybt17*), ICEKp3 (*ybt9*), ICEKp4 (*ybt10*), e ICEKp5 (*ybt14*). As variantes foram amplamente relacionadas com os sorotipos dos isolados (ST e K-type). Dentre elas, *ybt0* (YbST 346) e *ybt17* (YbST 269) estiveram associadas à *clb3*, onde esses *loci* foram carregados por ICEKp10 em linhagens ST 11-KL64 e ST 11-KL27. Notavelmente, o número de relatos envolvendo cepas virulentas de *K. pneumoniae* ST 11 contendo os *loci ybt* e *clb* tem aumentado de maneira importante ^{123,124}. Isso se deve ao fato da presença de plasmídeos que carregam genes de virulência, tal como o pLVPK e seus derivados, que podem estar sendo incorporados por Kp-KPC ¹²⁵. Além disso, há relatos sobre a ocorrência dessas linhagens bacterianas contendo esses *loci* em animais silvestres e em rios¹²⁶, o que

demonstra sua disseminação fora do contexto hospitalar, representando um alerta epidemiológico ainda mais preocupante.

De acordo com a ferramenta PlasmidFinder, 25 replicons plasmidiais foram detectados, sendo 18 associados ao grupo COLINFEC e 21 ao grupo ONLYCOL. Mesmo assim, não houve diferença significativa entre os replicons detectados em ambos os grupos. O IncFIB_K e o IncFII_K foram os replicons prevalentes, sendo detectados em 40 e 38 isolados, respectivamente, seguidos por ColRNAI (n = 33) e IncN (n = 25) (**Figura 7**).

IncFIB_K e o IncFII_K são replicons prevalentes em, praticamente, todos os isolados de *K. pneumoniae* sequenciados no mundo, apesar da ampla diversidade de grupos de incompatibilidade encontrada na espécie ¹²⁷. Além disso, eles estão entre os principais vetores de transferência de resistência antimicrobiana, juntamente com IncN, IncR e IncX3, que compõem um seletivo grupo de grandes plasmídeos conjugativos (auto transmissíveis), embora plasmídeos pequenos (mobilizáveis) também possam abrigar genes de resistência em *K. pneumoniae* ¹²⁸.

Devido a essa importante relação de determinados grupos de incompatibilidade de plasmídeos com genes de resistência a antimicrobianos, uma ferramenta de bioinformática conhecida como plasmid Multi Locus Sequence Typing (pMLST) foi desenvolvida para detectar e caracterizar, *in silico*, a sequência tipo de plasmídeos (pST) típicos de Enterobacteriaceae ⁷⁹. Neste sentido, a partir da montagem *de novo* do conteúdo plasmidial, foi possível estabelecer os pST dos plasmídeos do nosso estudo. Assim, oito diferentes pST de IncF foram detectadas, sendo a ST K1:A-B- (n = 18), com maior ocorrência, seguido de ST K5:A-B- (n = 10) e ST K2:A-B- (n = 7). Em relação aos plasmídeos IncC, as pST identificadas foram ST 3 (n = 26) e ST 15 (n = 2), e para o IncN, apenas a ST 15 foi encontrada.

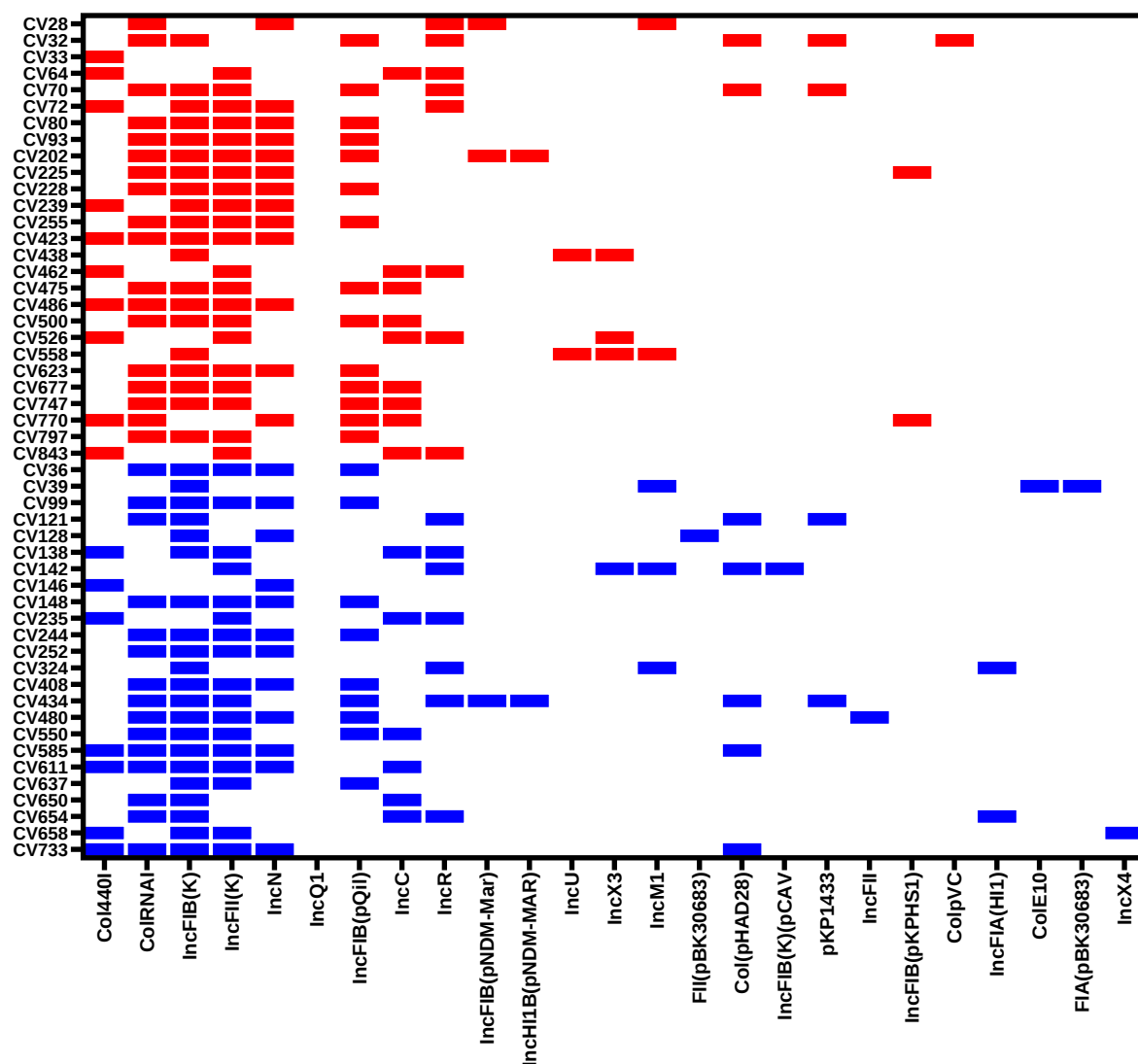


Figura 7: Plasmidoma dos 51 isolados de Kp-KPC. Quadrados preenchidos: presença do replicon; em branco: ausência. Quadrados azuis representam os isolados pertencentes ao grupo “ONLYCOL”, e quadrados vermelhos, ao grupo “COLINFEC”.

Adicionalmente, foi realizada a predição de outros elementos genéticos móveis (EGM), como sequências de inserção, transposons, integrons e ICE, em que 44 EGM estiveram associados ao grupo ONLYCOL, e 40 ao COLINFEC (**Figura 8**). Dentre os EGM detectados, a variabilidade de IS foi predominante, totalizando 76,4% ($n = 39$) de todos os EGM identificados. As ISs *ISKpn26* e *ISKpn14* foram as mais identificadas entre as linhagens do estudo, seguidas de *ISNCY*, *ISEcl1* e *IS6100*. De modo geral, as ISs foram igualmente distribuídas em ambos os grupos. No entanto, foi possível associar *ISNCY* ($p < 0,001$) e *IS5* ($p < 0,001$) ao grupo COLINFEC. Em relação aos ICEs, foram detectados ICEs associados ao sistema de secreção do tipo IV (*ICEKp3*,

associadas à resistência aos antibióticos, tais como colistina e tetraciclina ^{130,131}. Adicionalmente, há relatos sobre outros representantes dessa família de transposases associadas à resistência aos metais telúrio (*ter*) e ao arsênio (*ars*) ^{132,133}.

Por outro lado, as transposases da família IS5 são mais bem descritas em Enterobacterales, e o seu papel no processo de resistência é melhor compreendido. Um caso de destaque é sua associação à resistência às polimixinas por interrupção do gene *mgrB* em isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases ^{115,134}. Adicionalmente, resistência a outras drogas de relevância clínica associadas a elementos da família IS5 foram reportadas, onde a transposase se integra à região promotora do *operon* de uma bomba de efluxo, aumentando a sua atividade contra a tigeciclina ¹³⁵. Em outro estudo, foi reportado que IS5-like podem ter sido cruciais para a aquisição do gene *bla_{NDM-4}* em *K. pneumoniae* ¹³⁶. Algo semelhante também foi observado em outros estudos, onde foi relatada a presença de IS5 à jusante aos genes *bla_{NDM-1}*, *bla_{CTX-M-32}*, *bla_{CTX-M-15}*, *aac(6')-Ib-cr*, *bla_{OXA-1}* e *catB3* ¹³⁷⁻¹⁴⁰.

Em nosso estudo, não foi possível estabelecer uma relação direta entre essas ISs com os genes de resistência. Porém, indiretamente, foi possível identificar a presença de *ISThi1* e *ISLad2* dentro de estruturas mobilizáveis maiores (plasmídeos e ICE) que estavam associadas a genes de resistência, o que sugere que esses elementos podem desempenhar papéis importantes na evolução e na disseminação dos genes.

Assim, foi realizada uma análise de genômica comparativa, onde todas as anotações gênicas dos genomas dos isolados de Kp-KPC foram cuidadosamente examinadas, com a finalidade de verificar determinantes genéticos candidatos a serem marcadores de diferenciação entre bactérias COLINFEC e ONLYCOL. As análises de pangenoma revelaram um total de 13.189 anotações gênicas entre os 51 isolados do estudo, sendo que 2.549 genes compuseram o genoma core, e 10.640 anotações gênicas foram atribuídas ao genoma acessório (**Figura 9**).

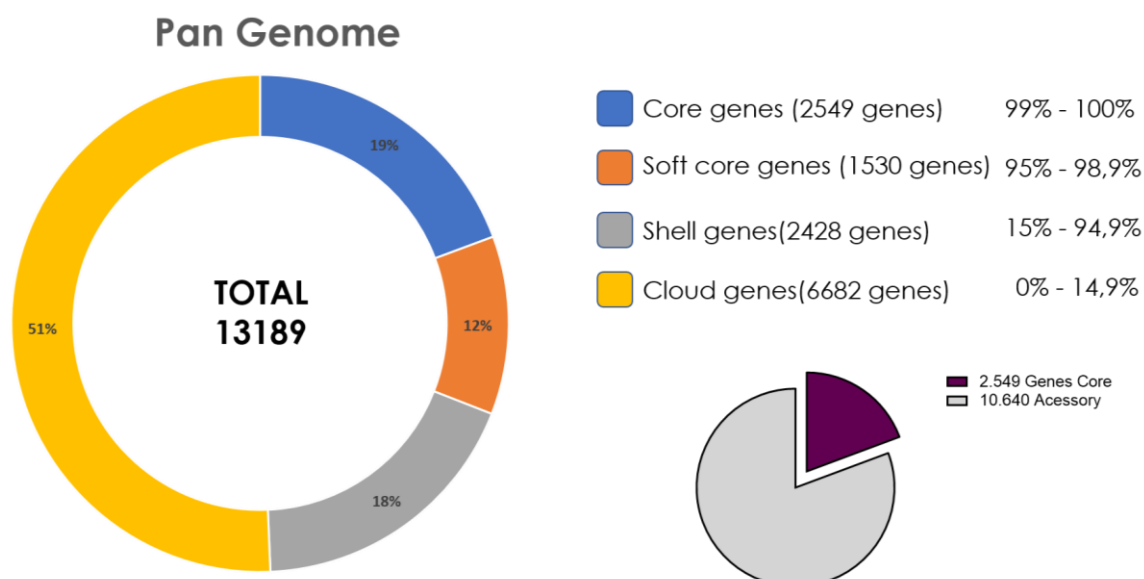


Figura 9: Representação da composição do pangenoma de 51 isolados de Kp-KPC do estudo.

Embora seja possível observar um número importante de anotações gênicas conservadas na população do estudo (genoma core), a estruturação do genoma acessório compõe mais de 80,0% dos genes, demonstrando uma variação expressiva na composição dos genes entre as linhagens. Diante disso, foi realizada uma análise da composição gênica dos isolados pertencentes a ambos os grupos. De acordo com os resultados obtidos com auxílio da ferramenta Scoary, 17 anotações gênicas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os grupos, sendo 10 anotações associadas ao grupo ONLYCOL e 7 ao grupo COLINFEC (**Figura 10**).

Dentre as anotações associadas ao grupo ONLYCOL, quatro foram referentes ao metabolismo de arsênio (*arsH*, *arsC_2*, *arsB_2* e *arsR2*), três proteínas relacionadas ao transporte dos íons sódio (*nhaA_2*), fluoreto (*crcB_2*) e sulfato (*sulP_1*), e três proteínas definidas como porina do carboidrato maltose, maltoporina (*lamB*), proteína de estresse universal (*uspA*), e transportador facilitador principal (MSF), respectivamente (**Apêndice F**).

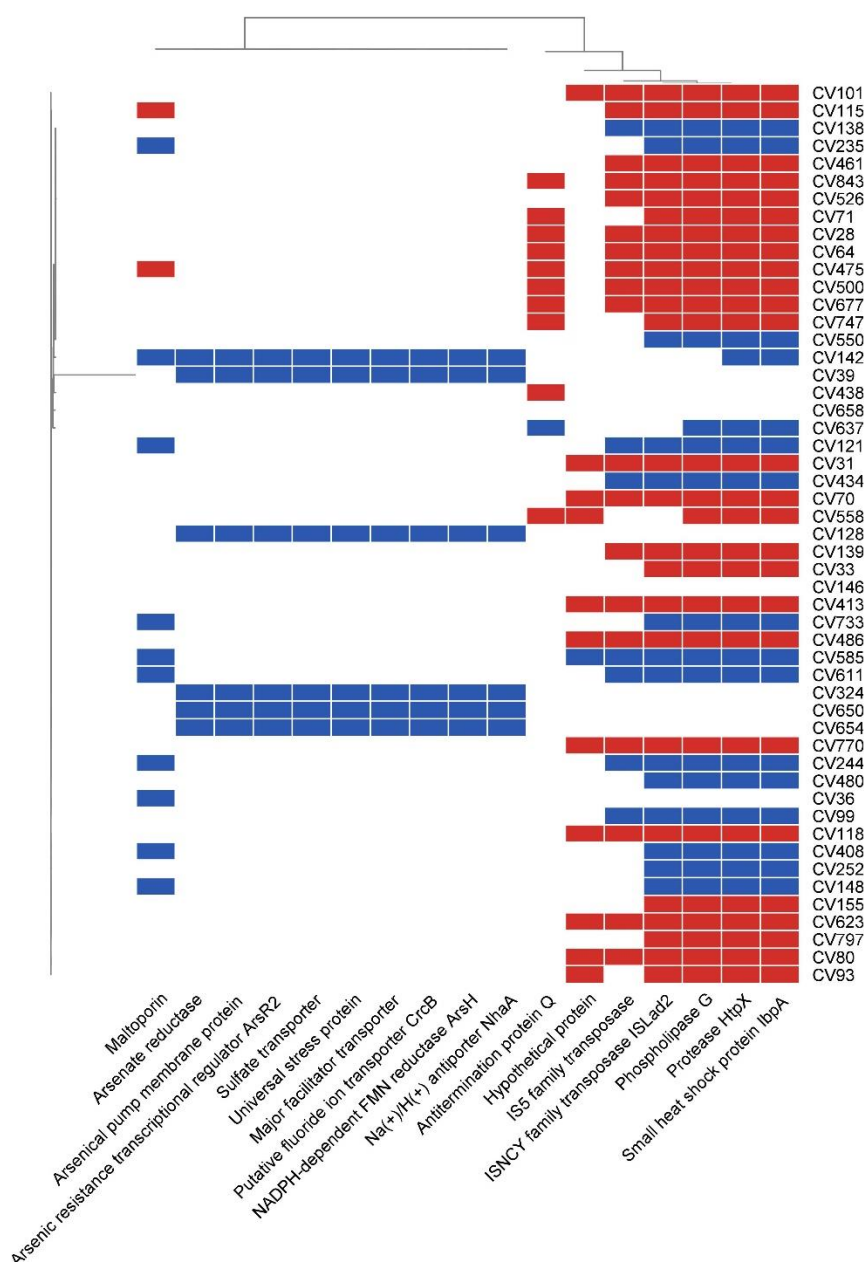


Figura 10: Construção filogenética dos Kp-KPC contendo as anotações gênicas que divergiram estatisticamente entre os grupos. Árvore vertical: filogenia baseada em máxima verossimilhança construída a partir do genoma core dos isolados. Árvore horizontal: agrupamento referente à presença e ausência das anotações gênicas relacionadas aos isolados de ambos os grupos. Quadrados preenchidos: presença das anotações gênicas; em branco: ausência. Quadrados azuis representam isolados pertencentes ao grupo “ONLYCOL”, e quadrados vermelhos, ao grupo “COLINFEC”.

Em relação ao grupo COLINFEC, dentre as sete diferentes anotações gênicas listadas, duas foram consistentes com os resultados apresentados previamente no mobiloma, onde as transposases *ISLad2* e *ISThi1* tiveram relação com o grupo. Adicionalmente, foram detectados o fator transcricional de antiterminação Q, uma proteína de choque térmico (*IbpA*), uma protease (*HtpX*), uma fosfolipase D, e uma

proteína hipotética não caracterizada devido aos parâmetros de confiabilidade (baixa cobertura e identidade – **Apêndice F**).

No geral, a maioria das anotações gênicas associadas ao grupo ONLYCOL foram relacionadas à resistência ao metal arsênio e a proteínas de transporte de íons ou carboidratos. Todos esses conjuntos de genes, com exceção da maltoporina, foram relatados contíguos nas linhagens que os abrigavam (**Figura 11**), e os mesmos não foram detectados em Kp-KPC pertencentes ao grupo COLINFEC (**Figura 10**).

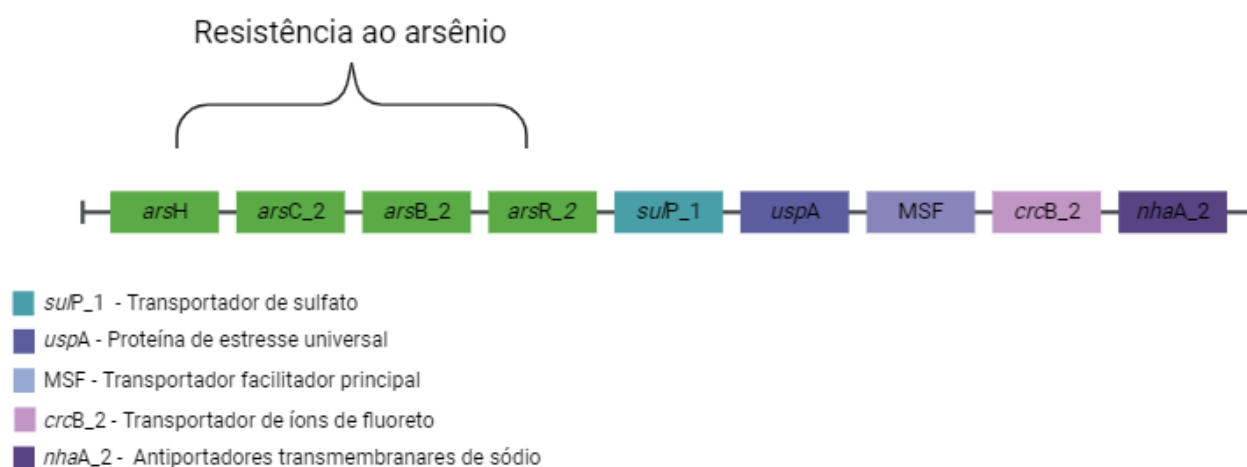


Figura 11: Representação esquemática da composição das anotações gênicas relacionadas ao grupo ONLYCOL que foram carregadas de forma contíguas.

Similarmente, um estudo conduzido para investigar a ocorrência de EGM associados a ambientes poluídos, curiosamente, também relatou a ocorrência de proteínas de transporte que expulsam pequenas moléculas e íons da célula através da membrana interna, como o transportador de efluxo de flúor CrcB. Essa proteína estava sendo codificada por um *operon* contendo genes que atuavam juntos, que incluíam as proteínas universais do estresse, o antiportador NhaA de Na^+/H^+ , e o transportador de ânions inorgânicos da família SulP, que contribuem para mitigar o estresse osmótico ¹⁴¹. Adicionalmente, esse conjunto de genes foi encontrado associado ao *operon* ars1RBCH ¹⁴¹. Assim, a ocorrência dessa estruturação gênica em clones de *K. pneumoniae* de alto risco global, como também demonstrado em nosso estudo, ilustra a interconexão desses genes entre diferentes ambientes, o que

reforça a necessidade de estudos de vigilância abrangentes que contemplem uma abordagem em Saúde Única.

De modo geral, os determinantes genéticos relacionados à resistência aos metais pesados são, comumente, relatados em isolados obtidos de ambientes, onde ocorre uma maior ação antrópica (agricultura e aquicultura), que contribuem para o excesso de metais tóxicos no meio ambiente ^{109,142,143}. Apesar disso, há relatos de isolados de *K. pneumoniae* MDR contendo genes de resistência aos metais pesados no ambiente hospitalar, e o papel deles no processo infeccioso ainda é incerto ^{144,145}. Neste contexto, mesmo com o conhecimento sobre as anotações gênicas dos isolados de Kp-KPC associadas ao grupo ONLYCOL, as análises apresentadas aqui são insuficientes para afirmar que há uma alteração do *fitness* em relação a essas linhagens. Além disso, devemos ser cautelosos ao generalizar essas informações para outras populações de *K. pneumoniae*. Entretanto, embora a relevância dessas anotações gênicas possa ser limitada em um possível processo infeccioso, não podemos descartá-las completamente.

A relação de um determinado gene e o seu papel no processo de patogenicidade é muito ampla e complexa, e todo o contexto molecular onde esses genes estão inseridos precisam ser levados em consideração ^{146,147}. Em um estudo que objetivou a busca de possíveis determinantes genéticos associados ao processo infeccioso em *K. pneumoniae*, foi relatada a presença dos genes de resistência a metais pesados *ars*, *pco*, e *sil* em um mesmo plasmídeo ¹⁶, genes relacionados à maior capacidade da bactéria em resistir à ação da resposta imune inata do hospedeiro ^{148,149}. Embora os resultados daquele estudo sejam contrastantes aos apresentados aqui, há diferenças importantes que devem ser observadas. Diversos genes conhecidos pelo seu papel na patogenicidade são carregados pelo mesmo plasmídeo onde o gene *arsD* estava inserido no referido trabalho ¹⁶, o que não foi possível ser observado no presente estudo. Além disso, o quadro clínico entre os pacientes de ambos os estudos diverge consideravelmente, o que torna ainda mais complexa a discussão, e, consequentemente, difícil alcançar uma comparação fidedigna.

A escassez de trabalhos dessa natureza, não somente com *K. pneumoniae*, mas com todos os patógenos relevantes no cenário clínico, dificulta uma discussão robusta sobre o tema. Os únicos trabalhos disponíveis focam na maquinaria genética de

isolados que causam infecção e em grupos de pacientes colonizados assintomáticos, que, em sua grande maioria, apresentam isolados sensíveis aos antimicrobianos e pertencentes a grupos clonais menos relevantes no cenário clínico. Apesar da importância epidemiológica destes trabalhos, entendemos que a problemática dentro do cenário hospitalar são Kp-KPC clássicas não hipervirulentas que colonizam e, eventualmente, progridem para um processo infeccioso ¹⁵⁰.

Diante disso, o presente estudo trouxe, pela primeira vez, uma comparação da maquinaria genética entre Kp-KPC clássicas que somente foram associadas à colonização das que aparentemente progrediram para o processo infeccioso em pacientes com condições clínicas similares. O fato deste estudo ter sido direcionado para essas cepas de Kp-KPC em uma mesma unidade hospitalar ajuda a explicar o motivo de não ter sido detectado nenhuma diferença significativa entre as anotações gênicas associadas à resistência aos antibióticos entre os grupos. O mesmo se aplica ao viruloma e ao plasmidoma, onde entendemos que a distribuição desses elementos é influenciada pelo gene *bla_{KPC-2}*, que é a principal marca de seleção do patógeno neste ambiente. Apesar disso, várias anotações gênicas associadas à infecção previram funções proteicas que podem alterar diretamente a fisiologia das bactérias, como previamente relatado ^{151–153}.

Um exemplo disso são as proteínas de choque térmico IbpA, a protease HtpX, a fosfolipase D e proteína de antiterminação Q, que estiveram associadas ao grupo COLINFEC. As proteínas de choque térmico (HSPs) são induzidas pelo calor, e funcionam na estabilização de proteínas intracelulares contra o estresse térmico. Essas proteínas, também conhecidas como chaperonas, respondem a outros tipos de estresses, tais como substâncias oxidantes e agentes químicos ^{154–156}. Neste contexto, um estudo mostrou que a expressão de HSPs IbpA/IbpB é regulada positivamente durante a colite experimental e protege, especificamente, cepas de *Escherichia coli* não patogênicas contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas por macrófagos ¹⁵⁷.

Nossos resultados mostraram que apenas IbpA foi atribuída às anotações associadas ao grupo COLINFEC, enquanto IbpB (27 COLINFEC e 21 ONLYCOL) esteve presente na maioria dos isolados de ambos os grupos. Embora essas proteínas possam exercer funções de forma independente, a presença conjunta de

IbpA e IbpB, geralmente, confere uma proteção mais eficiente e robusta contra o estresse térmico, e tal fato pode ter conferido uma ação mais efetiva no grupo COLINFEC de Kp-KPC estudado.

Adicionalmente, as HSPs podem ser induzidas e responderem à condição de estresse durante a fase inicial da formação de biofilme ^{158,159}. Já foi demonstrado que o mutante IbpA (silenciado) em *E. coli* inibiu o crescimento do biofilme na interface líquida ¹⁵⁸, e em outro estudo, a IbpA foi uma dentre as HSPs que influenciaram a capacidade de formação de biofilme, colonização e virulência em *Vibrio alginolyticus* ¹⁶⁰. Neste contexto, embora houvesse alta ocorrência do fenótipo de produção de biofilme observada entre os Kp-KPC do nosso estudo (**Tabela 4**), não foi possível estabelecer uma relação direta entre a IbpA e o fenótipo de produção de biofilme.

Em relação à protease HtpX; esta é uma enzima que pertence à família das metaloprotease e desempenha um papel importante na degradação de proteínas mal dobradas ou danificadas, tendo papel fundamental na regulação e na qualidade de proteínas na célula ¹⁶¹. Assim como a IbpA, há relatos de HtpX exercendo papel essencial na resposta ao estresse ¹⁶². Em *E. coli*, a expressão de HtpX é regulada positivamente pela resposta ao choque térmico e pela resposta ao estresse extra citoplasmático ¹⁶³. Embora HtpX não seja essencial para a sobrevivência bacteriana em condições normais de crescimento, a sua interrupção provoca o crescimento celular sensível à temperatura ^{161,163,164}. Além disso, alguns homólogos de HtpX são induzidos por danos à membrana causados pelo tratamento com antibióticos aminoglicosídeos, e, como consequência, afetam a atividade do antimicrobiano ^{165,166}.

Neste contexto, alguns estudos tem relatado a associação de HtpX e outras proteases com a resistência intrínseca a aminoglicosídeos, e sugerem que essas proteases são consideradas potenciais alvos adjuvantes de aminoglicosídeos ¹⁶⁷. Curiosamente, em nosso estudo, todos os Kp-KPC obtidos de ambos os grupos apresentaram alta frequência de resistência aos aminoglicosídeos, especialmente, à gentamicina (82,0%), e, praticamente, todos os isolados que continham HtpX, foram resistentes a, pelo menos, um aminoglicosídeo. Apesar disso, não foi possível estabelecer relação direta entre a protease HtpX e o perfil de resistência, pois alguns Kp-KPC que não continham a protease também apresentaram resistência à gentamicina ou à amicacina. Além disso, inúmeros determinantes genéticos

associados à resistência a aminoglicosídeos foram relatados simultaneamente, tais como *aac(3)-IIa*, *aac(3)-IIId*, *aac(6')-Ib3*, *aac(6')-Ib-cr*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id*, o que dificulta uma melhor compreensão do papel da protease neste processo.

Outra anotação gênica que esteve associada ao grupo COLINFEC foi a fosfolipase D (PLD). Esta proteína atua na hidrólise de fosfolipídios, promovendo a quebra da ligação fosfodiéster encontrada nos lipídios fosfatidilcolina e fosfatidilinositol¹⁶⁸. A PLD desempenha um papel fundamental em vários processos celulares, como na comunicação celular (produção de biofilmes) e metabolismo de lipídios^{153,169}. Além disso, fosfolipases da família D têm sido descritas como fatores importantes para a patogenicidade, como na invasão da célula hospedeira, na disseminação bacteriana e na progressão da doença¹⁶⁹⁻¹⁷².

Em *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a PLD é também conhecida como exotoxina lipase D, que é considerado um proeminente fator de virulência¹⁷³. A PLD induz lesões, aumento da permeabilidade vascular *in vivo* e hemólise sinérgica de células sanguíneas^{170,174}. Adicionalmente, estudos com cepas de *C. pseudotuberculosis* com PLD inativada demonstraram, de forma convincente, a necessidade da PLD para o desenvolvimento de doenças em animais¹⁷⁴. Esses estudos demonstram uma possível plausibilidade na associação da fosfolipase D com isolados do grupo COLINFEC.

Na década passada, foi reportada, pela primeira vez, a ação da fosfolipase da família D como fator de virulência em *K. pneumoniae*¹⁷⁵. Naquela ocasião, o silenciamento do gene resultou em uma menor virulência em modelo de infecção por pneumonia em camundongos. Além disso, foi relatado que o gene *pld-1* expresso estava associado aos isolados de *K. pneumoniae* de infecções graves. Contudo, embora haja evidências sobre a importância da PLD no papel de patogenicidade para determinadas espécies, poucos estudos foram conduzidos visando a caracterização e a disseminação de PLD, principalmente entre isolados MDR pertencentes à família Enterobacteriaceae^{175,176}. Dessa forma, estudos adicionais são necessários para comprovar seu real valor no processo infeccioso de Kp-KPC.

De modo similar ao conjunto de anotações gênicas relacionadas ao grupo ONLYCOL, também foi possível estabelecer relação entre algumas anotações gênicas associadas ao grupo COLINFEC. Os genes *pld*, *htpX2* e *ibpA2* foram

detectados conjuntamente nas linhagens pertencentes ao grupo COLINFEC (**Figura 12**). Adicionalmente, foi observado que a sequência de inserção ISLad2 (presente em quase todos os isolados Kp-KPC que continham este conjunto de genes) também estava compondo essa estrutura genética, em uma região muito próxima, no mesmo *contig*, o que sugere que essa IS pode estar relacionada à mobilização dos genes.



Figura 12: Representação esquemática da composição das anotações gênicas relacionadas ao grupo COLINFEC detectadas em regiões próximas, dentro de um mesmo *contig*. A ordem dos genes demonstrada na imagem variou entre os isolados. Outros elementos genéticos presentes entre as anotações gênicas no *contig* não foram listados.

As proteínas HtpX e IbpA são reguladas pelo fator de transcrição $\sigma 32$, e ambas já foram relatadas, simultaneamente, no processo de recuperação de proteínas danificadas por diferentes tipos de estresse, incluindo ação de antibióticos ^{163,177,178}. Além disso, outras proteínas que participam da regulação de HSPs e metaloproteases também interagem diretamente com PLD ^{179,180}, sugerindo que esses elementos podem ter alguma relação fisiológica na bactéria.

No geral, essas anotações gênicas associadas ao grupo COLINFEC foram observadas em diferentes linhagens de Kp-KPC, independente do grupo de estudo. No entanto, foi possível associá-las aos clones de maior relevância dentro do cenário clínico (CC 258 e ST 16). Em contrapartida, a proteína de antiterminação Q não foi detectada nas linhagens ST 11, e teve maior ocorrência nas ST 16. As proteínas antiterminadoras controlam a expressão gênica, reconhecendo sinais próximos ao promotor e, dessa forma, evitando a terminação da transcrição ^{181,182}. Essas proteínas são amplamente encontradas em bactérias. Porém, inicialmente, a proteína de

antiterminação Q foi descrita em bacteriófagos λ , onde controla a expressão de genes precoces e tardios, sendo, portanto, essencial para o ciclo de vida do vírus, não da bactéria ¹⁸³.

A presença de uma proteína de antiterminação pode impactar diretamente na transcrição de genes adjacentes, que, normalmente, não seriam transcritos. Dessa forma, poderiam ter sido adaptadas por bactérias patogênicas para melhorar a aptidão no hospedeiro ¹⁸⁴. Em *E. coli*, existem relatos sobre proteínas de antiterminação associadas à regulação central de importantes determinantes genéticos relacionados à patogenicidade, como na síntese de lipopolissacarídeo (LPS), cápsula polissacarídica, alfa-hemolisinas, fator necrosante citotóxico 1, e na mobilização de plasmídeo F ¹⁸⁵.

Em nosso estudo, diversas anotações gênicas foram detectadas à jusante da proteína de antiterminação Q, incluindo transportadores de íons e açúcares, estruturas de bacteriófagos, e proteínas hipotéticas. No entanto, não foi possível associá-la a genes conhecidamente relacionados à virulência, o que dificultou uma melhor compreensão do papel dessas proteínas no processo de infecção. Apesar disso, nós mostramos que as anotações gênicas associadas ao grupo COLINFEC, mesmo que indiretamente, poderiam contribuir de diferentes formas no processo de patogenicidade.

4.7 Verificação fenotípica da virulência em modelo de infecção *in vivo*

A partir de todo o contexto genético verificado, para obter mais informações sobre a capacidade dos isolados de Kp-KPC que apresentaram as anotações gênicas associadas ao grupo COLINFEC causarem infecção, ensaios envolvendo modelo de infecção *in vivo* utilizando larvas de *G. mellonella* foram realizados em representantes de ambos os grupos. Ao todo, 22 isolados de Kp-KPC foram investigados, sendo 12 pertencentes ao grupo COLINFEC, contendo as proteínas PLD, HtpX, IbpA e proteína de antiterminação Q, e 10 Kp-KPC ao grupo ONLYCOL, que não continham qualquer uma dessas anotações gênicas (**Apêndices G e H**).

No geral, a sobrevivência das larvas infectadas foi similar em ambos os grupos, não havendo diferença significativa na frequência de sobrevivência das larvas até 96 horas (**Figura 13**). No entanto, foi observado que, nas primeiras 24 horas, isolados do grupo COLINFEC apresentaram maior capacidade de mortalidade quando comparados aos do grupo ONLYCOL ($p = 0,01$) (**Figura 13a**). Após este período, a discrepância entre as frequências de sobrevivência das larvas foi diminuindo ao longo do experimento (**Figura 13b-d**). Entre 72 e 96 horas, não houve alterações relevantes (**Figura 13d**).

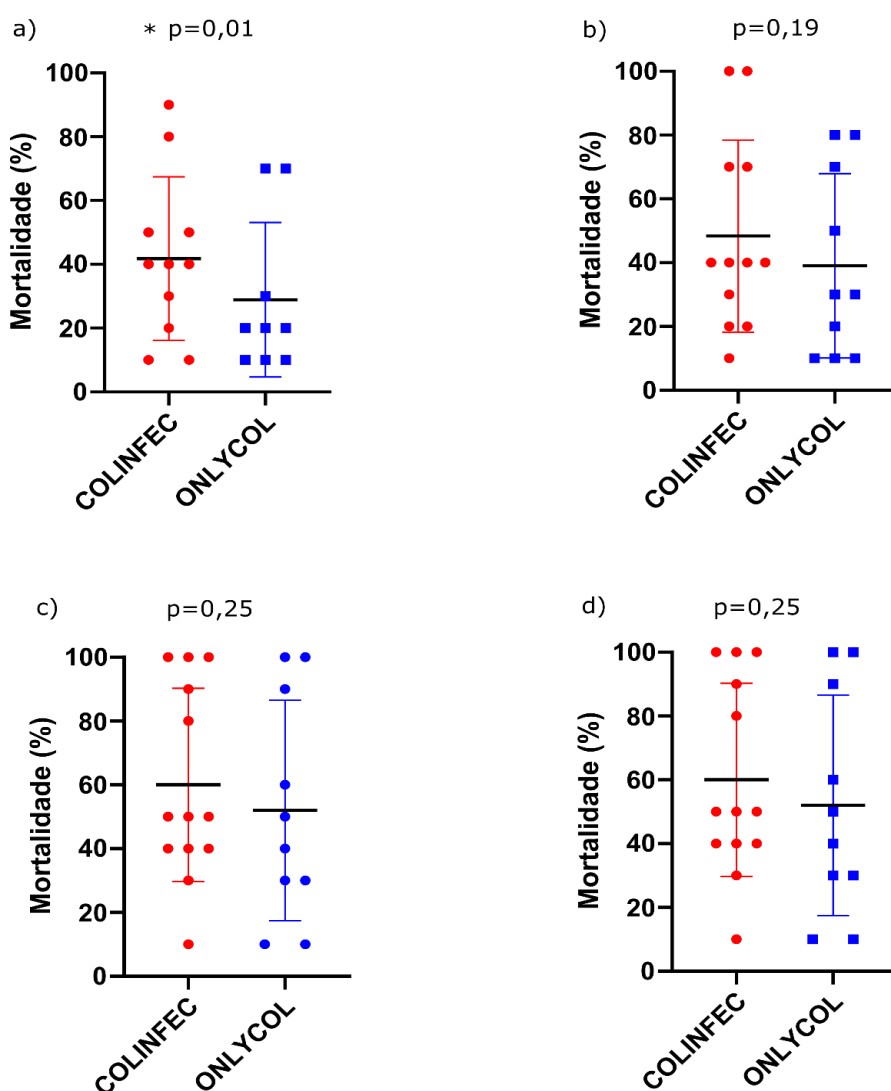


Figura 13: Mortalidade em modelo de infecção em larvas de *G. mellonella* após o desafio com representantes de ambos os grupos. Larvas foram infectadas com $6-7 \times 10^4$ UFC; a) mortalidade de larvas após 24 horas; b) mortalidade após 48 horas; c) mortalidade após 72 horas; d) mortalidade após 96 horas. *: os valores de p foram calculados usando o método de Kaplan-Meier e testes log-rank (Mantel-Cox).

Embora tenha havido diferença significativa na mortalidade das larvas apenas nas primeiras 24 horas do experimento, quando analisamos as linhagens do estudo de maneira isolada e independente do grupo ao qual pertencem, é possível observar diferenças importantes na capacidade de causar infecção ao longo do tempo. Tal fato foi relatado com as linhagens ST 11-KL64, que causaram a morte de, em média, 70,0% das larvas nas primeiras horas do experimento, e eliminando, praticamente, todas as larvas após 96 horas (**Figura 14**). No entanto, o mesmo não pode ser observado nas outras linhagens do estudo, incluindo as linhagens pertencentes à ST 11 com diferentes K-type (ex. KL50 e KL75) (**Figura 14**).

Curiosamente, a linhagem de Kp-KPC ST 16-KL50, relacionada ao grupo COLINFEC, apresentou maior capacidade de causar infecção nas larvas em relação às demais linhagens não ST 11-KL64 nas primeiras 24 horas (**Figura 14a**). Porém, isso não foi observado nas horas seguintes até o final do experimento (**Figura 14b-c**). Consistentemente, a maioria dos representantes pertencentes ao grupo COLINFEC que foram submetidos ao teste de capacidade de infecção em *G. mellonella* eram Kp-KPC ST 16-KL50 (58,3%). Tal fato pode explicar o motivo do grupo ter tido maior virulência nas primeiras 24 horas em relação ao grupo ONLYCOL.

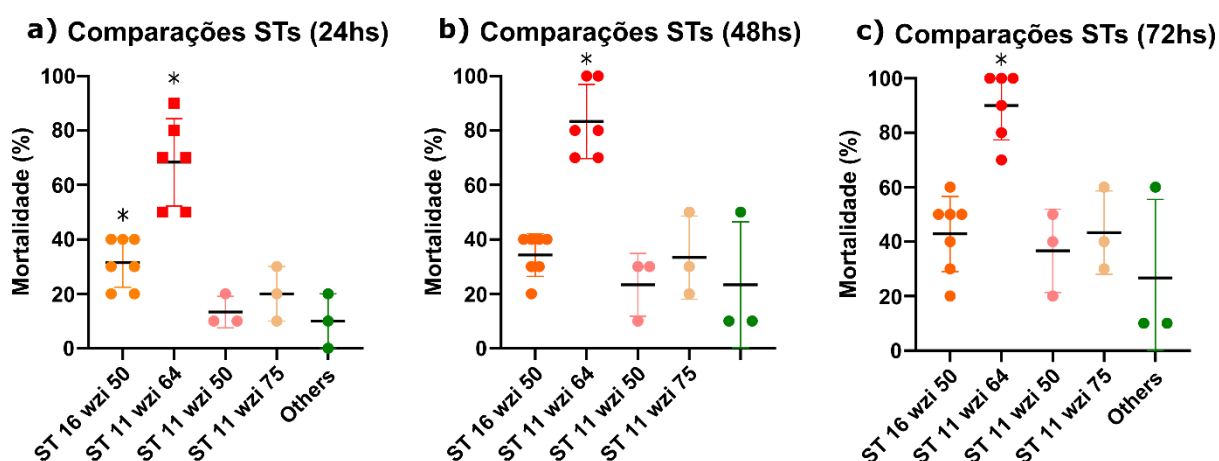


Figura 14: Mortalidade em modelo de infecção em *G. mellonella* após o desafio com representantes de diferentes linhagens ao longo de 72 horas. Larvas foram infectadas com $6-7 \times 10^4$ UFC. *: os valores de p foram calculados usando o método de Kaplan-Meier e testes log-rank (Mantel-Cox).

Geralmente, os relatos envolvendo ensaios com *G. mellonella* mostram que, nas primeiras horas após a infecção, ocorre uma diminuição na condição de saúde das larvas, e o número de sobreviventes tende a cair acentuadamente após 24 horas^{186,187}. No entanto, em nosso estudo, foi observado que isolados do grupo COLINFEC apresentaram maior mortalidade das larvas somente nas primeiras 24 horas, onde mais de 40,00% das larvas morreram, e apenas 20,0% morreram entre 48 e 96 horas. Esses resultados sugerem que as linhagens de Kp-KPC dos dois grupos podem ter tido estratégias distintas para interagir com o hospedeiro no início da infecção, mas acabaram resultando em níveis semelhantes de mortalidade em 48, 72 e 96 horas. Para uma melhor compreensão sobre o impacto dessas anotações gênicas no processo de patogenicidade, aconselha-se a complementação com experimentos que avaliem a atividade isolada desses genes, além de ensaios envolvendo outros modelos.

Dentre as anotações gênicas exclusivas aos isolados Kp-KPC ST 16-KL50 que foram submetidos aos ensaios de infecção *in vivo* estão as proteínas de antiterminação Q, que, como mencionado anteriormente, não foi possível associá-las a fatores conhecidamente importantes no processo de infecção, o que inviabiliza atribuímos um comportamento específico a essa proteína. No entanto, há relatos sobre a presença de outras proteínas de antiterminação que regulam o processo de transcrição e que estão envolvidas na maior capacidade de causar virulência em *G. mellonella*, como as proteínas NagY descritas em *Enterococcus faecalis*¹⁸⁸. Dessa forma, para uma melhor elucidação sobre o papel das proteínas de antiterminação no processo de patogenicidade, sugerimos que mais estudos sobre o seu impacto no processo de regulação e transcrição gênica sejam conduzidos.

Com a finalidade de comparar a efetividade da infecção causada por isolados Kp-KPC ST 11-KL64 (score de virulência 2) em relação a um clone que apresentou menos determinantes genéticos associados à virulência (score de virulência 0), como o ST 502-KL20, um experimento adicional foi conduzido com diferentes concentrações de bactérias inoculadas nas larvas de *G. mellonella*. A partir das frequências de mortalidade das larvas, foi possível observar que o isolado CV101 ST 11-KL64 (na concentração de $1,4 \times 10^2$ UFC/mL) apresentou maior virulência quando comparado ao isolado CV658 ST 502-KL20, mesmo este estando em maior concentração ($6,2 \times$

10^5 UFC/mL) (**Figura 15**). A alta capacidade de cepas Kp-KPC ST 11-KL64 de causarem infecção em *G. mellonella* pode estar relacionada à presença de dois importantes determinantes genéticos associados à hipervirulência, colibactina e yersiniabactina, que foram detectados simultaneamente somente nessa linhagem. Tal fato sugere que esses dois *loci* estejam agindo de forma sinérgica para aumentar a capacidade de virulência dessas linhagens.

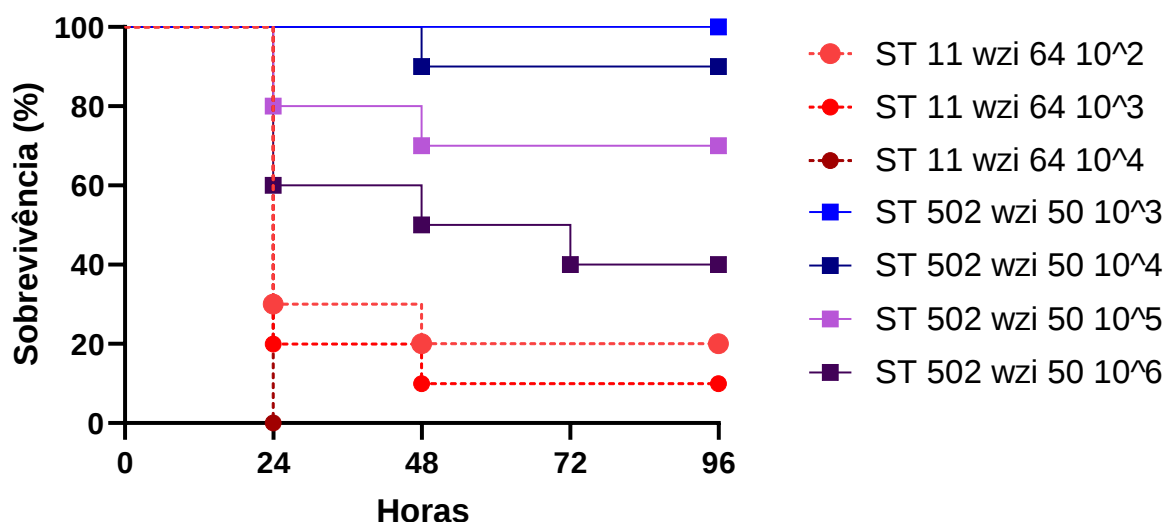


Figura 15: Sobrevivência em modelo de infecção em *G. mellonella* após o desafio com as linhagens ST 11-KL64 e ST 502-KL50 em diferentes concentrações (UFC/mL) ao longo de 96 horas. Cada linha representa um isolado único.

Outra possível explicação para este fenótipo de alta mortalidade de larvas observado nas larvas é a presença da toxina colibactina, uma vez que linhagens que continham somente yersiniabactina (e não colibactina) demonstraram menor eficiência (**Apêndice G e H**). No entanto, para isso, ensaios envolvendo isolados contendo somente *clb* seriam necessários para avaliar a habilidade em causar infecção nas larvas, o que não encontramos entre os 51 isolados sequenciados.

Um estudo recente demonstrou os efeitos citotóxicos elevados causados por colibactina no DNA de células do epitélio intestinal de *G. mellonella*, o que resultou em maior mortalidade das larvas¹⁸⁹. Similarmente, essa discrepância também foi relatada em cepas abrigando ambos os fatores de virulência. Porém, em sua grande maioria, pertenciam ao clone hipervirulento CC 23-KL2 e continham outros genes associados à virulência¹⁹⁰, o que não foi encontrado nos nossos isolados. Por outro

lado, outro estudo relatou que o clone ST 16-KL51 (*ybt*+) apresentou maior frequência de mortalidade em *G. mellonella* quando comparado à linhagem ST 11-KL64 (*ybt*+ e *clb*+). No entanto, os autores não puderam definir se outros determinantes genéticos desconsiderados associados ao processo infeccioso estiveram envolvidos. Além disso, não pôde ser comprovado se os *loci ybt* e *clb* estavam funcionais. Neste sentido, esses relatos demonstram que muitas lacunas relacionadas à interação de *K. pneumoniae* e o hospedeiro ainda precisam ser melhores esclarecidas.

No presente estudo, identificamos linhagens de Kp-KPC e anotações gênicas que estiveram associadas ao grupo de Kp-KPC que apareceram colonizando e causando infecção em pacientes hospitalizados (COLINFEC), independentemente dos fatores de risco apresentados. Estes genes foram encontrados no genoma acessório de Kp-KPC, sendo, a maioria, carreada simultaneamente pelo mesmo elemento genético móvel. Tal fato sugere que esses genes podem ser mediadores diretos de *fitness* e virulência, ou marcadores indiretos de elementos mobilizáveis que podem influenciar na dinâmica da patogenicidade. Além disso, nosso estudo relatou que isolados de Kp-KPC que continham esses genes apresentaram maior virulência em *G. mellonella* nas primeiras 24 horas da infecção.

Além disso, o presente estudo demonstrou a alta capacidade da linhagem Kp-KPC ST 11-KL64 de causar infecção em larvas de *G. mellonella*, e que a presença de indicadores de hipervirulência em cepas consideradas de alto risco pode ser responsável por este comportamento. Esses achados são preocupantes uma vez que essa linhagem é globalmente relatada em ambientes hospitalares, inclusive, no Brasil ^{8,33,191,192}. Curiosamente, essa linhagem também foi responsável por maior ocorrência de infecções na ala pediátrica do mesmo complexo hospitalar estudado no presente trabalho ⁴⁷. Este fato sugere a persistência deste patógeno na instituição, enfatizando a necessidade de adotar medidas de intervenção eficazes.

Adicionalmente, mostramos que o genoma acessório exerce um papel crucial que pode estar associado ao processo de patogenicidade. Dessa forma, estes resultados podem servir como um ponto de partida para estudos futuros, fornecendo subsídios para que abordagens similares possam ser exploradas visando uma possível intervenção. Entretanto, este estudo apresenta limitações importantes que dificultam uma melhor compreensão sobre o papel dos genes no processo de

patogenicidade. Primeiramente, é centralizado e retrospectivo, contando, apenas, com a disponibilidade de dados clínicos de prontuário eletrônico e uma amostragem relativamente pequena. Estudos prospectivos multicêntricos, com maior amostragem e períodos prolongados, que visem avaliar a associação entre as anotações gênicas identificadas neste estudo e a infecção corrente serão úteis para validar os achados.

Um segundo ponto a ser avaliado é a relação complexa de um determinado gene e um processo de patogenicidade, que pode estar atuando em diferentes etapas da interação patógeno-hospedeiro. Um exemplo disso é a capacidade do patógeno em colonizar o trato gastrointestinal, onde sua densidade populacional é determinante para a progressão da doença ^{14,103}. Entretanto, não foi possível acessarmos a composição da microbiota intestinal dos pacientes a fim obter informações sobre a quantificação dessas anotações gênicas encontradas em nosso estudo, assim como a sua abundância relativa, uma vez que se tratou de um estudo retrospectivo. A detecção dessas anotações gênicas em bactérias no trato gastrointestinal dos pacientes seria importante para validar sua participação na etapa de colonização do hospedeiro. Adicionalmente, não foi avaliado o potencial de transferência horizontal de genes entre as cepas do nosso estudo, o que seria fundamental para verificar a capacidade de transferência entre as anotações gênicas associadas ao grupo COLINFEC.

5 CONCLUSÃO

A enzima KPC-2 foi a única carbapenemase detectada em nosso estudo. A resistência às polimixinas foi exclusivamente associada às modificações causadas no gene codificador da proteína MgrB. A linhagem ST 16-KL50-Ob3 foi a única associada ao grupo de Kp-KPC que causaram infecção subsequentemente à colonização do paciente, assim como, o replicon IncK_F foi o responsável por carrear o gene *bla*_{KPC-2} neste grupo. Yersiniabactina e colibactina foram reportadas concomitantemente associados à ICEKp10. No geral, a composição do resistoma, do viruloma e do plasmidoma não apresentou diferença significativa em ambos os grupos avaliados. Apesar disso, genes representantes do *operon* de resistência ao arsênio (*arsH*, *arsC*, *arsB* e *arsR*), um transportador de sulfato (*sulP-1*), uma proteína de estresse universal

(*uspA*), um transportador facilitador universal (MFS), um transportador de fluoreto (*crcB*), um transportador de sódio (*nhaA*) e uma maltoporina (*lamB*) estiveram relacionados ao grupo de Kp-KPC que somente colonizaram os pacientes (ONLYCOL).

Por outro lado, a protease HtpX, a proteína de choque térmico IbpA, a fosfolipase D e as sequências de inserção IS*Lad2* e IS5 estiveram associadas ao grupo de Kp-KPC que estava colonizando pacientes altamente similar àqueles causando infecção (COLINFEC). Além disso, as linhagens que continham essas anotações gênicas apresentaram maior virulência em larvas de *G. mellonella* durante as primeiras horas de infecção. A linhagem ST 11-KL64 (*ybt+* e *clb+*) demonstrou maior virulência no modelo de infecção *in vivo* em relação às demais linhagens do estudo, mesmo em menores concentrações. Estas descobertas contribuem para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à patogenicidade de Kp-KPC, sobretudo, podem ter implicações importantes no desenvolvimento de intervenções futuras direcionadas à prevenção dessas infecções.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharm Ther.* 2015;40(4):277.
2. Gorrie CL, Mirčeta M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell RA, et al. Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. *Clin Infect Dis.* 2017;65(2):208–15.
3. Martin RM, Cao J, Wu W, Zhao L, Manthei DM, Pirani A, et al. Identification of pathogenicity-associated loci in *Klebsiella pneumoniae* from hospitalized patients. *Msystems.* 2018;3(3):10–1128.
4. Mohd Asri NA, Ahmad S, Mohamud R, Mohd Hanafi N, Mohd Zaidi NF, Irekeola AA, et al. Global prevalence of nosocomial multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review and meta-analysis. *Antibiotics.* 2021;10(12):1508.
5. Moglad E, Alanazi N, Altayb HN. Genomic Study of Chromosomally and Plasmid-Mediated Multidrug Resistance and Virulence Determinants in *Klebsiella Pneumoniae* Isolates Obtained from a Tertiary Hospital in Al-Kharj, KSA. *Antibiotics.* 2022;11(11):1564.
6. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):318–27.
7. Tsioutis C, Eichel VM, Mutters NT. Transmission of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae*: the role of infection control. *J Antimicrob Chemother.* 2021;76(Supplement_1):i4–11.
8. Aires CAM, Pereira PS, Rocha-de-Souza CM, Silveira MC, Carvalho-Assef APD, Asensi MD. Population structure of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from surveillance rectal swabs in Brazil. *Microb Drug Resist.* 2020;26(6):652–60.
9. Kopotsa K, Osei Sekyere J, Mbelle NM. Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. *Ann N Y Acad Sci.* 2019;1457(1):61–91.
10. Gelband H, Miller Molly P, Pant S, Gandra S, Levinson J, Barter D, et al. The state of the world's antibiotics 2015. *Wound Heal South africa.* 2015;8(2):30–4.
11. Osme SF, Almeida APS, Lemes MF, Barbosa WO, Arantes A, Mendes-Rodrigues C, et al. Costs of healthcare-associated infections to the Brazilian public Unified Health System in a tertiary-care teaching hospital: a matched case–control study. *J Hosp Infect.* 2020;106(2):303–10.
12. Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(3):1028–33.
13. Tian D, Pan F, Wang C, Sun Y, Zhang H. Resistance phenotype and clinical molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among pediatric patients in Shanghai. *Infect Drug Resist.* 2018;11:1935.
14. Sun Y, Patel A, SantaLucia J, Roberts E, Zhao L, Kaye K, et al. Measurement of *Klebsiella* intestinal colonization density to assess infection risk. *Msphere.* 2021;6(3):10–1128.

15. Rao K, Patel A, Sun Y, Vornhagen J, Motyka J, Collingwood A, et al. Risk factors for *Klebsiella* infections among hospitalized patients with preexisting colonization. *Mosphere*. 2021;6(3):e00132-21.
16. Vornhagen J, Roberts EK, Unverdorben L, Mason S, Patel A, Crawford R, et al. Combined comparative genomics and clinical modeling reveals plasmid-encoded genes are independently associated with *Klebsiella* infection. *Nat Commun*. 2022;13(1):4459.
17. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(6):344–59.
18. Lam MMC, Wick RR, Watts SC, Cerdeira LT, Wyres KL, Holt KE. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nat Commun*. 2021;12(1):4188.
19. 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., Morgane. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016;66(12):5575–99.
20. Arato V, Raso MM, Gasperini G, Berlanda Scorza F, Micoli F. Prophylaxis and treatment against *Klebsiella pneumoniae*: current insights on this emerging anti-microbial resistant global threat. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8):4042.
21. Logan LK, Nguyen DC, Huang FAS, Qureshi NK, Charnot-Katsikas A, Bartlett AH, et al. A multi-centered case-case-control study of factors associated with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae infections in children and young adults. *Pediatr Infect Dis J*. 2019;38(5):490.
22. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate point-prevalence survey of health care–associated infections. *N Engl J Med*. 2014;370(13):1198–208.
23. Anes J, Hurley D, Martins M, Fanning S. Exploring the genome and phenotype of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Front Microbiol*. 2017;8:1913.
24. Dolejska M, Brhelova E, Dobiasova H, Krivdova J, Jurankova J, Sevcikova A, et al. Dissemination of IncFIIK-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates from children in hospital paediatric oncology wards. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40(6):510–5.
25. Han YL, Wen XH, Zhao W, Cao XS, Wen JX, Wang JR, et al. Epidemiological characteristics and molecular evolution mechanisms of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol*. 2022;13:1003783.
26. O’Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016;
27. Scott RD. The direct medical costs of healthcare-associated infections in US hospitals and the benefits of prevention. 2009;
28. Tolentino FM, Bueno MFC, Franscisco GR, Barcelos DD de P, Lobo SM, Tomaz FMMB, et al. Endemicity of the High-Risk Clone *Klebsiella pneumoniae* ST340 Coproducing QnrB, CTX-M-15, and KPC-2 in a Brazilian Hospital. *Microb Drug Resist* [Internet]. 2019 May;25(4):528–37. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2018.0006>
29. Ibrahim ME. Risk factors in acquiring multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in a hospital setting in Saudi Arabia. *Sci Rep*. 2023;13(1):11626.
30. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections

- with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(1):56–66.
31. Sampaio JLM, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *brazilian J Microbiol.* 2016;47:31–7.
 32. Ramos-Castañeda JA, Ruano-Ravina A, Barbosa-Lorenzo R, Paillier-Gonzalez JE, Saldaña-Campos JC, Salinas DF, et al. Mortality due to KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: Systematic review and meta-analysis: Mortality due to KPC *Klebsiella pneumoniae* infections. *J Infect.* 2018;76(5):438–48.
 33. Raro OHF, da Silva RMC, Filho EMR, Sukiennik TCT, Stadnik C, Dias CAG, et al. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* From Transplanted Patients in Brazil: Phylogeny, Resistome, Virulome and Mobile Genetic Elements Harboring bla KPC–2 or bla NDM–1. *Front Microbiol.* 2020;11:1563.
 34. Magi G, Tontarelli F, Caucci S, Sante L Di, Brenciani A, Morroni G, et al. High prevalence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST307 recovered from fecal samples in an Italian hospital. *Future Microbiol.* 2020;16(10):703–11.
 35. Zhou J, Li G, Ma X, Yang Q, Yi J. Outbreak of colonization by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: Investigation, control measures and assessment. *Am J Infect Control.* 2015;43(10):1122–4.
 36. Zhu J, Sun L, Ding B, Yang Y, Xu X, Liu W, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST76 and ST37 isolates in neonates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(4):611–8.
 37. Kong Z, Cai R, Cheng C, Zhang C, Kang H, Ma P, et al. First reported nosocomial outbreak of NDM-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in China. *Infect Drug Resist.* 2019;3557–66.
 38. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, et al. Carbapenemase-producing organisms: a global scourge. *Clin Infect Dis.* 2018;66(8):1290–7.
 39. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol.* 2014;22(12):686–96.
 40. Yahav D, Giske CG, Grāmatniece A, Abodakpi H, Tam VH, Leibovici L. New β -lactam– β -lactamase inhibitor combinations. *Clin Microbiol Rev.* 2020;34(1):10–1128.
 41. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(27):E3574–81.
 42. Bi W, Liu H, Dunstan RA, Li B, Torres VVL, Cao J, et al. Extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* causing nosocomial bloodstream infections in China: molecular investigation of antibiotic resistance determinants, informing therapy, and clinical outcomes. *Front Microbiol.* 2017;8:1230.
 43. Boff L, de Sousa Duarte H, Kraychete GB, de Castro Santos MG, Vommaro RC, Lima COGX, et al. Characterization of an emergent high-risk KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* lineage causing a fatal wound infection after spine surgery. *Infect Genet Evol.* 2021;96:105122.
 44. Bathoorn E, Rossen JW, Lokate M, Friedrich AW, Hammerum AM. Isolation of an NDM-5-producing ST16 *Klebsiella pneumoniae* from a Dutch patient without

- travel history abroad, August 2015. *Eurosurveillance*. 2015;20(41):30040.
45. Andrey DO, Pereira Dantas P, Martins WBS, Marques De Carvalho F, Almeida LGP, Sands K, et al. An Emerging Clone, *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2–Producing K. pneumoniae Sequence Type 16, Associated With High Mortality Rates in a CC258-Endemic Setting. *Clin Infect Dis*. 2020;71(7):e141–50.
 46. Nguyen TNT, Nguyen PLN, Le NTQ, Nguyen LPH, Duong TB, Ho NDT, et al. Emerging carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 16 causing multiple outbreaks in a tertiary hospital in southern Vietnam. *Microb genomics*. 2021;7(3).
 47. do Valle Barroso M, da Silva CR, Benfatti LR, Gozi KS, de Andrade LK, Andrade LN, et al. Characterization of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and affected patients of a pediatric hospital in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2023;106(2):115932.
 48. de Sales RO, Leaden L, Migliorini LB, Severino P. A Comprehensive Genomic Analysis of the Emergent *Klebsiella pneumoniae* ST16 Lineage: Virulence, Antimicrobial Resistance and a Comparison with the Clinically Relevant ST11 Strain. *Pathogens*. 2022;11(12):1394.
 49. NDIAYE I, Bissoume Sambe BA, THIAM F, Mouhamadou Moustapha B, Ousmane SOW, CISSÉ A, et al. Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Involved in Healthcare-Associated Infections in Dakar, Senegal. *Arch Microbiol Immunol*. 2023;7(2):65–75.
 50. Martins WMBS, Nicolas MF, Yu Y, Li M, Dantas P, Sands K, et al. Clinical and molecular description of a high-copy IncQ1 KPC-2 plasmid harbored by the international ST15 *Klebsiella pneumoniae* clone. *Msphere*. 2020;5(5):e00756-20.
 51. Tolera M, Marami D, Abate D, Dheresa M. Are invasive procedures and a longer hospital stay increasing the risk of healthcare-associated infections among the admitted patients at Hiwot Fana specialized university Hospital, eastern Ethiopia? *Adv Prev Med*. 2020;2020.
 52. Meatherall BL, Gregson D, Ross T, Pitout JDD, Laupland KB. Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Am J Med*. 2009;122(9):866–73.
 53. Martin RM, Cao J, Brisse S, Passet V, Wu W, Zhao L, et al. Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *MSphere*. 2016;1(5):10–1128.
 54. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(3):e00001-19.
 55. Henson SP, Boinett CJ, Ellington MJ, Kagia N, Mwarumba S, Nyongesa S, et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* invasive infections over a decade at Kilifi County Hospital in Kenya. *Int J Med Microbiol*. 2017;307(7):422–9.
 56. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):629–61.
 57. Achard MES, Chen KW, Sweet MJ, Watts RE, Schroder K, Schembri MA, et al. An antioxidant role for catecholate siderophores in *Salmonella*. *Biochem J*. 2013;454(3):543–9.
 58. Lam MMC, Wick RR, Wyres KL, Gorrie CL, Judd LM, Jenney AWJ, et al. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding

- mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. *Microb genomics*. 2018;4(9).
59. Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, Passet V, Jones L, Delannoy-Vieillard AS, et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(11):1812.
 60. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(1):177–83.
 61. Long SW, Olsen RJ, Eagar TN, Beres SB, Zhao P, Davis JJ, et al. Population genomic analysis of 1,777 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates, Houston, Texas: unexpected abundance of clonal group 307. *MBio*. 2017;8(3):e00489-17.
 62. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268–81.
 63. Ferreira CM. Molecular Epidemiology of KPC-2 Producing *Klebsiella pneumoniae*. *SOJ Microbiol Infect Dis [Internet]*. 2017 Jul 14;5(3):1–3. Available from: <https://symbiosisonlinepublishing.com/microbiology-infectiousdiseases/microbiology-infectiousdiseases76.php>
 64. Weller TMA, MacKenzie FM, Forbes KJ. Molecular epidemiology of a large outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol*. 1997;46(11):921–6.
 65. Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyne MS, Kubota K, Graves L, et al. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol*. 2005;43(3):1045–50.
 66. Han H, Zhou H, Li H, Gao Y, Lu Z, Hu K, et al. Optimization of pulse-field gel electrophoresis for subtyping of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(7):2720–31.
 67. ANVISA. Critérios diagnósticos de infecção relacionada a assistência a saúde. 2.ed. [Internet]. 2017. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3074175/PNPCIRAS+2016-2020/f3eb5d51-616c-49fa-8003-0dcb8604e7d9>
 68. Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos – BrCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. 2022;
 69. Seifi K, Kazemian H, Heidari H, Rezagholizadeh F, Saei Y, Shirvani F, et al. Evaluation of biofilm formation among *Klebsiella pneumoniae* isolates and molecular characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur J Microbiol*. 2016;9(1).
 70. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura G Di, Djukić S, Ćirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*. 2007;115(8):891–9.
 71. LEE H, CHUANG Y, YU W, LEE N, CHANG C, KO N, et al. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia. *J Intern Med*. 2006;259(6):606–14.

72. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–20.
73. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19(5):455–77.
74. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072–5.
75. Galardini M, Biondi EG, Bazzicalupo M, Mengoni A. CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. *Source Code Biol Med*. 2011;6:1–5.
76. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30(14):2068–9.
77. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(12):3491–500.
78. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:1–9.
79. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(7):3895–903.
80. Durrant MG, Li MM, Siranosian BA, Montgomery SB, Bhatt AS. A bioinformatic analysis of integrative mobile genetic elements highlights their role in bacterial adaptation. *Cell Host Microbe*. 2020;27(1):140–53.
81. Cosentino S, Voldby Larsen M, Møller Aarestrup F, Lund O. PathogenFinder-distinguishing friend from foe using bacterial whole genome sequence data. *PLoS One*. 2013;8(10):e77302.
82. Liu M, Li X, Xie Y, Bi D, Sun J, Li J, et al. ICEberg 2.0: an updated database of bacterial integrative and conjugative elements. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D660–5.
83. Siguier P, Pérochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(suppl_1):D32–6.
84. Néron B, Littner E, Haudiquet M, Perrin A, Cury J, Rocha EPC. IntegronFinder 2.0: identification and analysis of integrons across bacteria, with a focus on antibiotic resistance in *Klebsiella*. *Microorganisms*. 2022;10(4):700.
85. Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(suppl_1):D325–8.
86. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*. 2015;31(22):3691–3.
87. Minh BQ, Trifinopoulos J, Schrempf D, Schmidt HA, Lanfear R. IQ-TREE version 2.0: tutorials and Manual Phylogenomic software by maximum likelihood. URL <http://www.iqtree.org>. 2019;
88. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, Von Haeseler A, Jermiin LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods*. 2017;14(6):587–9.
89. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(W1):W256–9.

90. Brynildsrud O, Bohlin J, Scheffer L, Eldholm V. Rapid scoring of genes in microbial pan-genome-wide association studies with Scoary. *Genome Biol.* 2016;17:1–9.
91. Insua JL, Llobet E, Moranta D, Pérez-Gutiérrez C, Tomás A, Garmendia J, et al. Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *Galleria mellonella*. *Infect Immun.* 2013;81(10):3552–65.
92. Piatek M, Sheehan G, Kavanagh K. *Galleria mellonella*: the versatile host for drug discovery, in vivo toxicity testing and characterising host-pathogen interactions. *Antibiotics.* 2021;10(12):1545.
93. Baker MA, Sands KE, Huang SS, Kleinman K, Septimus EJ, Varma N, et al. The impact of coronavirus disease 2019 (COVID-19) on healthcare-associated infections. *Clin Infect Dis.* 2022;74(10):1748–54.
94. McMullen KM, Smith BA, Rebmann T. Impact of SARS-CoV-2 on hospital acquired infection rates in the United States: Predictions and early results. *Am J Infect Control* [Internet]. 2020 Nov;48(11):1409–11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196655320306349>
95. Zhanel GG, Lawson CD, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Lagacé-Wiens PRS, et al. Ceftazidime-Avibactam: a Novel Cephalosporin/ β -lactamase Inhibitor Combination. *Drugs* [Internet]. 2013 Feb 1;73(2):159–77. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40265-013-0013-7>
96. Sy CL, Chen PY, Cheng CW, Huang LJ, Wang CH, Chang TH, et al. Recommendations and guidelines for the treatment of infections due to multidrug resistant organisms. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2022 Jun;55(3):359–86. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1684118222000251>
97. López Montesinos I, Gómez-Zorrilla S, Palacios-Baena ZR, Prim N, Echeverría-Esnaola D, Gracia MP, et al. Aminoglycoside or Polymyxin Monotherapy for Treating Complicated Urinary Tract Infections Caused by Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: A Propensity Score-Adjusted and Matched Cohort Study. *Infect Dis Ther* [Internet]. 2022 Feb 3;11(1):335–50. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s40121-021-00570-z>
98. Lebeaux D, Fernández-Hidalgo N, Pilmis B, Tattevin P, Mainardi JL. Aminoglycosides for infective endocarditis: time to say goodbye? *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2020 Jun;26(6):723–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X19305531>
99. Ye Q, Wang Q, Chen Z, Chen W, Zhan Q, Wang C. Effectiveness, nephrotoxicity, and therapeutic drug monitoring of polymyxin B in nosocomial pneumonia among critically ill patients. *Clin Respir J* [Internet]. 2022 May 19;16(5):402–12. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/crj.13493>
100. Portier I, Campbell RA. Role of platelets in detection and regulation of infection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(1):70–8.
101. Middleton EA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets in pulmonary immune responses and inflammatory lung diseases. *Physiol Rev.* 2016;96(4):1211–59.
102. Hartwig J, Italiano Jr J. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1580–6.
103. Migliorini LB, Leaden L, de Sales RO, Correa NP, Marins MM, Koga PCM, et al. The gastrointestinal load of carbapenem-resistant enterobacteriaceae is associated with the transition from colonization to infection by *Klebsiella*

- pneumoniae isolates harboring the blaKPC gene. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:928578.
104. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J chinese Med Assoc*. 2018;81(1):7–11.
 105. Ramstedt M, Burmølle M. Can multi-species biofilms defeat antimicrobial surfaces on medical devices? *Curr Opin Biomed Eng*. 2022;22:100370.
 106. Zhang P, Shi Q, Hu H, Hong B, Wu X, Du X, et al. Emergence of ceftazidime/avibactam resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(1):124-e1.
 107. Guimarães T, Nouér SA, Martins RCR, Perdigão Neto L V, Martins WMBS, Narciso Barbosa AC, et al. Ceftazidime-avibactam as salvage therapy for infections caused by Enterobacteriales coresistant to carbapenems and polymyxins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(10):10–1128.
 108. Follador R, Heinz E, Wyres KL, Ellington MJ, Kowarik M, Holt KE, et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microb genomics*. 2016;2(8).
 109. Kumar P, Dash B, Suyal DC, Gupta SB, Singh AK, Chowdhury T, et al. Characterization of arsenic-resistant *Klebsiella pneumoniae* RnASA11 from contaminated soil and water samples and its bioremediation potential. *Curr Microbiol*. 2021;78:3258–67.
 110. Chen T, Wang Y, Zhou Y, Zhou W, Chi X, Shen P, et al. Recombination drives evolution of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 KL47 to KL64 in China. *Microbiol Spectr*. 2023;11(1):e01107-22.
 111. Esposito F, Cardoso B, Sellera FP, Sano E, Fuentes-Castillo D, Fontana H, et al. Expansion of healthcare-associated hypervirulent KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11/KL64 beyond hospital settings. *One Heal*. 2023;17:100594.
 112. de Araújo Longo LG, Fontana H, Santos de Sousa V, Chilingue Zambão da Silva N, Souto Martins I, Meurer Moreira B. Emergence of mgrB locus deletion mediating polymyxin resistance in pandemic KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 lineage. *J Med Microbiol*. 2021;70(3):1309.
 113. Firmo EF, Beltrão EMB, da Silva FRF, Alves LC, Brayner FA, Veras DL, et al. Association of blaNDM-1 with blaKPC-2 and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;21:255–61.
 114. Fuga B, Ferreira ML, Cerdeira LT, de Campos PA, Dias VL, Rossi I, et al. Novel small IncX3 plasmid carrying the blaKPC-2 gene in high-risk *Klebsiella pneumoniae* ST11/CG258. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020;96(2):114900.
 115. Furlan JPR, da Silva Rosa R, Ramos MS, Dos Santos LDR, Lopes R, Savazzi EA, et al. Genetic plurality of blaKPC-2-harboring plasmids in high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* of environmental origin. *Sci Total Environ*. 2023;881:163322.
 116. Shi L, Liang Q, Feng J, Zhan Z, Zhao Y, Yang W, et al. Coexistence of two novel resistance plasmids, bla KPC-2-carrying p14057A and tetA (A)-carrying p14057B, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Virulence*. 2018;9(1):306–11.
 117. Huang Y, Rana AP, Wenzler E, Ozer EA, Krapp F, Bulitta JB, et al. Aminoglycoside-resistance gene signatures are predictive of aminoglycoside MICs for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2022;77(2):356–63.

118. Zhan Q, Xu Y, Wang B, Yu J, Shen X, Liu L, et al. Distribution of fluoroquinolone resistance determinants in Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with bloodstream infections in China. *BMC Microbiol.* 2021;21(1):1–8.
119. Okunlola AT, Olowe OA, Taiwo SS. Healthcare associated infections caused by plasmid-encoded blaKPC and blaNDM strains of *Klebsiella pneumoniae* in Ibadan, Nigeria. *Pan Afr J Life Sci.* 2019;1:46–53.
120. Lawlor MS, O'connor C, Miller VL. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Infect Immun.* 2007;75(3):1463–72.
121. Nougayrède JP, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* (80-). 2006;313(5788):848–51.
122. Lee AHY, Porto WF, de Faria Jr C, Dias SC, Alencar SA, Pickard DJ, et al. Genomic insights into the diversity, virulence and resistance of *Klebsiella pneumoniae* extensively drug resistant clinical isolates. *Microb Genomics.* 2021;7(8):613.
123. Gu D, Dong N, Zheng Z, Lin D, Huang M, Wang L, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(1):37–46.
124. Wong MHY, Shum HP, Chen JHK, Man MY, Wu A, Chan EWC, et al. Emergence of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(1):24.
125. Liu C, Guo J. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hypermucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China: antimicrobial resistance patterns, molecular epidemiology and risk factor. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2019;18:1–11.
126. Morgado S, Fonseca E, Vicente AC. Genomics of *Klebsiella pneumoniae* species complex reveals the circulation of high-risk multidrug-resistant pandemic clones in human, animal, and environmental sources. *Microorganisms.* 2022;10(11):2281.
127. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):252–75.
128. Ramirez MS, Iriarte A, Reyes-Lamothe R, Sherratt DJ, Tolmasky ME. Small *Klebsiella pneumoniae* plasmids: neglected contributors to antibiotic resistance. *Front Microbiol.* 2019;10:2182.
129. Razavi M, Kristiansson E, Flach CF, Larsson DGJ. The association between insertion sequences and antibiotic resistance genes. *Msphere.* 2020;5(5):e00418-20.
130. Zhang RM, Liao MN, Wu J en, Lu X qing, Tan H zhen, Sun J, et al. Metagenomic insights into the influence of mobile genetic elements on ARGs along typical wastewater treatment system on pig farms in China. *Sci Total Environ.* 2022;839:156313.
131. Yuan Q, Xia P, Xiong L, Xie L, Lv S, Sun F, et al. First report of coexistence of blaKPC-2-, blaNDM-1-and mcr-9-carrying plasmids in a clinical carbapenem-resistant *Enterobacter hormaechei* isolate. *Front Microbiol.* 2023;14:1153366.
132. Kamathewatta K, Bushell R, Rafa F, Browning G, Billman-Jacobe H, Marenda M. Colonization of a hand washing sink in a veterinary hospital by an

- Enterobacter hormaechei strain carrying multiple resistances to high importance antimicrobials. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020;9(1):1–16.
133. Rocha J, Ferreira C, Mil-Homens D, Busquets A, Fialho AM, Henriques I, et al. Third generation cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae* thriving in patients and in wastewater: what do they have in common? *BMC Genomics*. 2022;23(1):1–14.
 134. da Silva DM, Faria-Junior C, Nery DR, de Oliveira PM, Silva L de OR, Alves EG, et al. Insertion sequences disrupting mgrB in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021;24:53–7.
 135. Zhang Z, Saier Jr MH. A novel mechanism of transposon-mediated gene activation. *PLoS Genet*. 2009;5(10):e1000689.
 136. Zhang F, Li Z, Liu X, Luo G, Wu Y, Li C, et al. Molecular Characteristics of an NDM-4 and OXA-181 Co-Producing K51-ST16 Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Study of Its Potential Dissemination Mediated by Conjugative Plasmids and Insertion Sequences. *Antimicrob Agents Chemother*. 2023;67(1):e01354-22.
 137. Fernandez A, Gil E, Cartelle M, Pérez A, Beceiro A, Mallo S, et al. Interspecies spread of CTX-M-32 extended-spectrum β -lactamase and the role of the insertion sequence IS 1 in down-regulating bla CTX-M gene expression. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(5):841–7.
 138. Perera P, Gamage S, de Silva HSM, Jayatilake SK, Silva N de, Aydin A, et al. The First Identification of Multidrug Resistant Uropathogenic *Enterobacter hormaechei* Subsp. *Steigerwaltii* St93 from Sri Lanka. 2021;
 139. Nurjadi D, Kocer K, Chanthalangsy Q, Klein S, Heeg K, Boutin S. New Delhi metallo-beta-lactamase facilitates the emergence of cefiderocol resistance in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022;66(2):e02011-21.
 140. Ding M, Shi J, Ud Din A, Liu Y, Zhang F, Yan X, et al. Co-infections of two carbapenemase-producing *Enterobacter hormaechei* clinical strains isolated from the same diabetes individual in China. *J Med Microbiol*. 2021;70(3):1316.
 141. Lekired A, Cherif-Silini H, Silini A, Yahia H Ben, Ouzari HI. Comparative genomics reveals the acquisition of mobile genetic elements by the plant growth-promoting *Pantoea eucrina* OB49 in polluted environments. *Genomics*. 2023;115(2):110579.
 142. Furlan JPR, Savazzi EA, Stehling EG. Genomic insights into multidrug-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* co-harboring metal resistance genes in aquatic environments. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020;201:110782.
 143. Anedda E, Farrell ML, Morris D, Burgess CM. Evaluating the impact of heavy metals on antimicrobial resistance in the primary food production environment: A scoping review. *Environ Pollut*. 2023;121035.
 144. Gancz A, Kondratyeva K, Cohen-Eli D, Navon-Venezia S. Genomics and virulence of *Klebsiella pneumoniae* Kpnu95 ST1412 harboring a novel Incf plasmid encoding bla ctx-M-15 and qnrS1 causing community urinary tract infection. *Microorganisms*. 2021;9(5):1022.
 145. Turton JF, Perry C, Claxton A. Do plasmids containing heavy metal resistance genes play a role in neonatal sepsis and invasive disease caused by *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola*? *J Med Microbiol*. 2022;71(8):1486.
 146. Casadevall A, Pirofski L. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun*. 1999;67(8):3703–13.

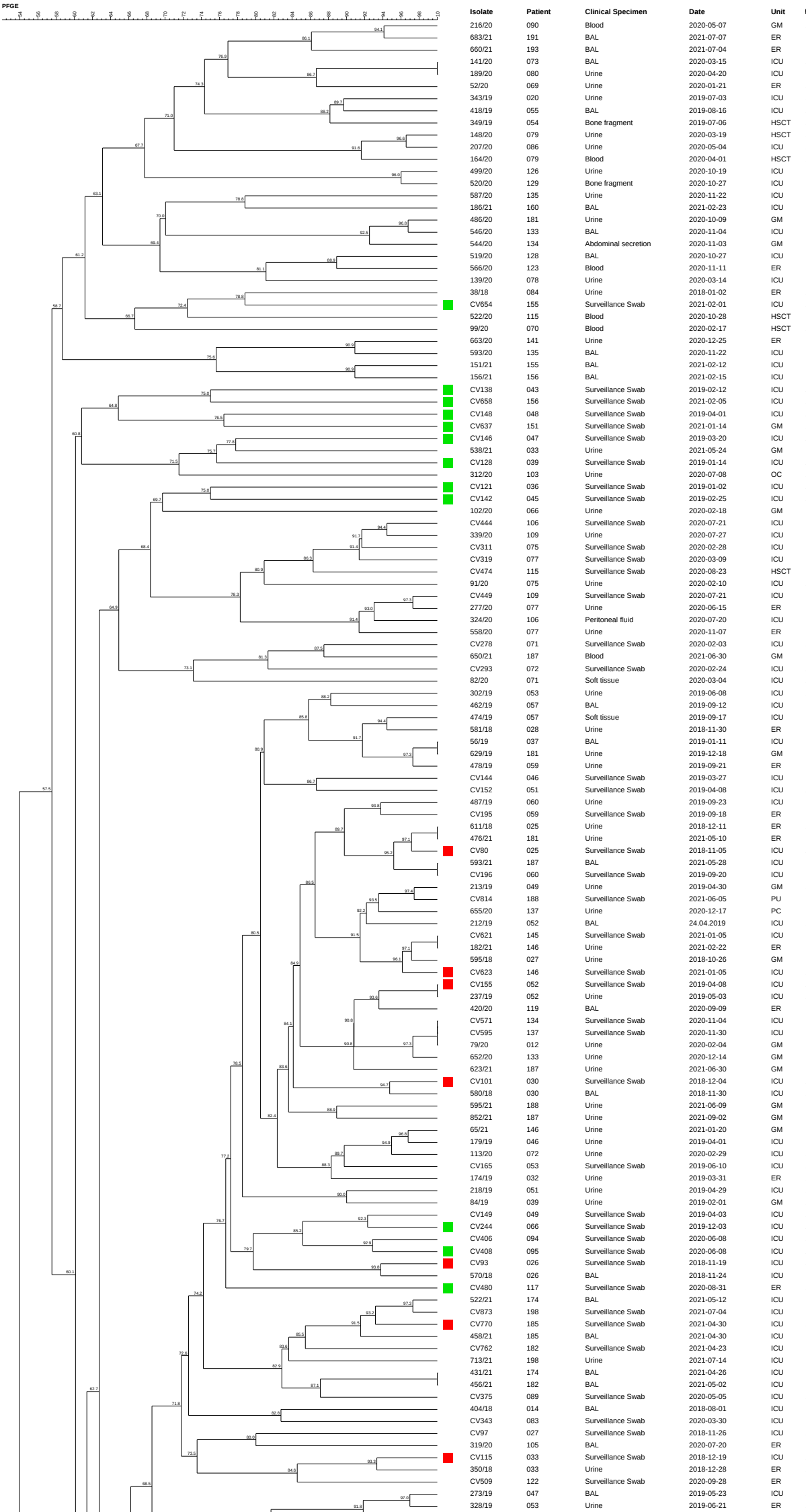
147. d'Enfert C, Kaune AK, Alaban LR, Chakraborty S, Cole N, Delavy M, et al. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiol Rev.* 2021;45(3):fuaa060.
148. Djoko KY, Cheryl-lynn YO, Walker MJ, McEwan AG. The role of copper and zinc toxicity in innate immune defense against bacterial pathogens. *J Biol Chem.* 2015;290(31):18954–61.
149. Rajer F, Sandegren L. The role of antibiotic resistance genes in the fitness cost of multiresistance plasmids. *MBio.* 2022;13(1):e03552-21.
150. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(2):10–1128.
151. Pan S, Malik IT, Thomy D, Henrichfreise B, Sass P. The functional ClpXP protease of *Chlamydia trachomatis* requires distinct clpP genes from separate genetic loci. *Sci Rep.* 2019;9(1):14129.
152. Kim SH, Ramos SC, Valencia RA, Cho Y II, Lee SS. Heat stress: effects on rumen microbes and host physiology, and strategies to alleviate the negative impacts on lactating dairy cows. *Front Microbiol.* 2022;13:804562.
153. Zhang Z, Chen M, Xu W, Zhang W, Zhang T, Guang C, et al. Microbial phospholipase D: Identification, modification and application. *Trends Food Sci Technol.* 2020;96:145–56.
154. Ow DSW, Lim DYX, Morin Nissom P, Camattari A, Wong VVT. Co-expression of Skp and FkpA chaperones improves cell viability and alters the global expression of stress response genes during scFvD1. 3 production. *Microb Cell Fact.* 2010;9(1):1–14.
155. Hendrick JP, Hartl FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem.* 1993;62(1):349–84.
156. Jeyachandran S, Chellapandian H, Park K, Kwak IS. A review on the involvement of heat shock proteins (extrinsic chaperones) in response to stress conditions in aquatic organisms. *Antioxidants.* 2023;12(7):1444.
157. Goeser L, Fan TJ, Tchaptchet S, Stasulli N, Goldman WE, Sartor RB, et al. Small heat-shock proteins, IbpAB, protect non-pathogenic *Escherichia coli* from killing by macrophage-derived reactive oxygen species. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120249.
158. Kuczyńska-Wiśnik D, Matuszewska E, Laskowska E. *Escherichia coli* heat-shock proteins IbpA and IbpB affect biofilm formation by influencing the level of extracellular indole. *Microbiology.* 2010;156(1):148–57.
159. Junker LM, Toba FA, Hay AG. Transcription in *Escherichia coli* PHL628 biofilms. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;268(2):237–43.
160. Zhang YL, Wu F, Huang YC, Jian JC, Cai SH. Mechanisms Underlying the Virulence and Intestinal Colonization of the *Vibrio alginolyticus* HY9901 DctP Protein with Proteomic Analysis. *Appl Biochem Microbiol.* 2023;59(5):646–58.
161. Sakoh M, Ito K, Akiyama Y. Proteolytic activity of HtpX, a membrane-bound and stress-controlled protease from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2005;280(39):33305–10.
162. Henry R, Lo M, Khoo C, Zhang H, Boysen RI, Picardeau M, et al. Precipitation of iron on the surface of *Leptospira interrogans* is associated with mutation of the stress response metalloprotease HtpX. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(15):4653–60.
163. Yoshitani K, Hizukuri Y, Akiyama Y. An in vivo protease activity assay for investigating the functions of the *Escherichia coli* membrane protease HtpX.

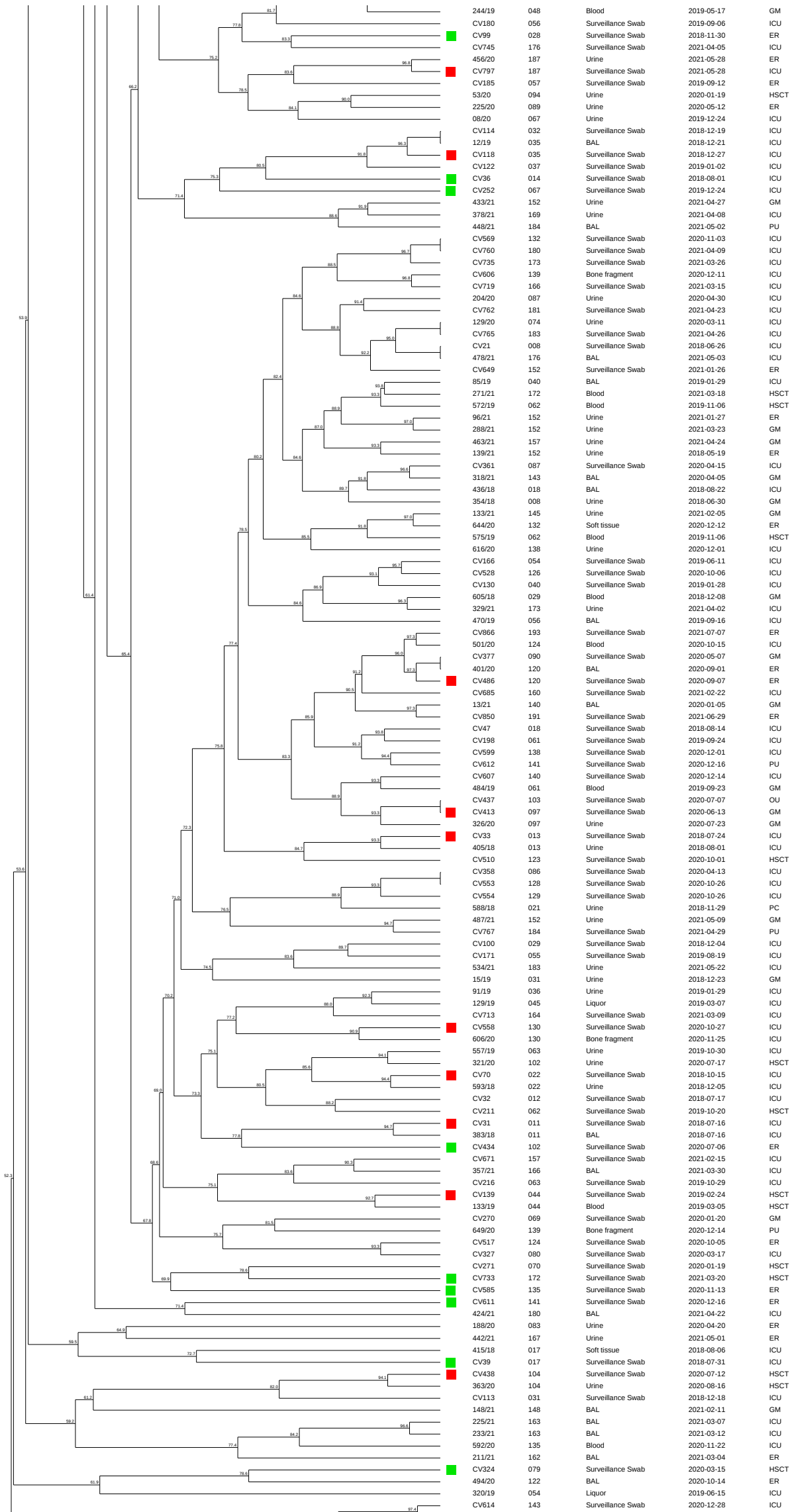
- FEBS Lett. 2019;593(8):842–51.
164. Shimohata N, Chiba S, Saikawa N, Ito K, Akiyama Y. The Cpx stress response system of *Escherichia coli* senses plasma membrane proteins and controls HtpX, a membrane protease with a cytosolic active site. *Genes to Cells*. 2002;7(7):653–62.
 165. Hinz A, Lee S, Jacoby K, Manoil C. Membrane proteases and aminoglycoside antibiotic resistance. *J Bacteriol*. 2011;193(18):4790–7.
 166. Poole K, Gilmour C, Farha MA, Mullen E, Lau CHF, Brown ED. Potentiation of aminoglycoside activity in *Pseudomonas aeruginosa* by targeting the AmgRS envelope stress-responsive two-component system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(6):3509–18.
 167. Huang HH, Lin YT, Chen PY, Li LH, Ning HC, Yang TC. ClpA and HtpX proteases are involved in intrinsic aminoglycoside resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* and are potential aminoglycoside adjuvant targets. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(8):10–1128.
 168. Yao Y, Li J, Lin Y, Zhou J, Zhang P, Xu Y. Structural insights into phospholipase D function. *Prog Lipid Res*. 2021;81:101070.
 169. Stahl J, Bergmann H, Götting S, Ebersberger I, Averhoff B. *Acinetobacter baumannii* virulence is mediated by the concerted action of three phospholipases D. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138360.
 170. McNamara PJ, Bradley GA, Songer JG. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol*. 1994;12(6):921–30.
 171. Hinnebusch J, Cherepanov P, Du Y, Rudolph A, Dixon JD, Schwan T, et al. Murine toxin of *Yersinia pestis* shows phospholipase D activity but is not required for virulence in mice. *Int J Med Microbiol*. 2000;290(4–5):483–7.
 172. McKean SC, Davies JK, Moore RJ. Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: the major virulence factor, phospholipase D, is downregulated at 43 C. *Res Microbiol*. 2007;158(3):279–86.
 173. Dias AA de S de O, Santos LS, Sabbadini PS, Santos CS, Silva Junior FC, Napoleão F, et al. *Corynebacterium ulcerans* diphtheria: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. *Rev Saude Publica*. 2011;45:1176–91.
 174. Simpson-Lourêdo L, Silva CMF, Hacker E, Souza NF, Santana MM, Antunes CA, et al. Detection and virulence potential of a phospholipase D-negative *Corynebacterium ulcerans* from a concurrent diphtheria and infectious mononucleosis case. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2019;112:1055–65.
 175. Lery LMS, Frangeul L, Tomas A, Passet V, Almeida AS, Bialek-Davenet S, et al. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor. *BMC Biol*. 2014;12:1–15.
 176. Catalán-Nájera JC, Garza-Ramos U, Barrios-Camacho H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? *Virulence*. 2017;8(7):1111–23.
 177. Miwa T, Taguchi H. *Escherichia coli* small heat shock protein IbpA plays a role in regulating the heat shock response by controlling the translation of $\sigma(32)$. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023 Aug;120(32):e2304841120.
 178. Nonaka G, Blankschien M, Herman C, Gross CA, Rhodius VA. Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, σ_{32} , reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes Dev*. 2006;20(13):1776–89.

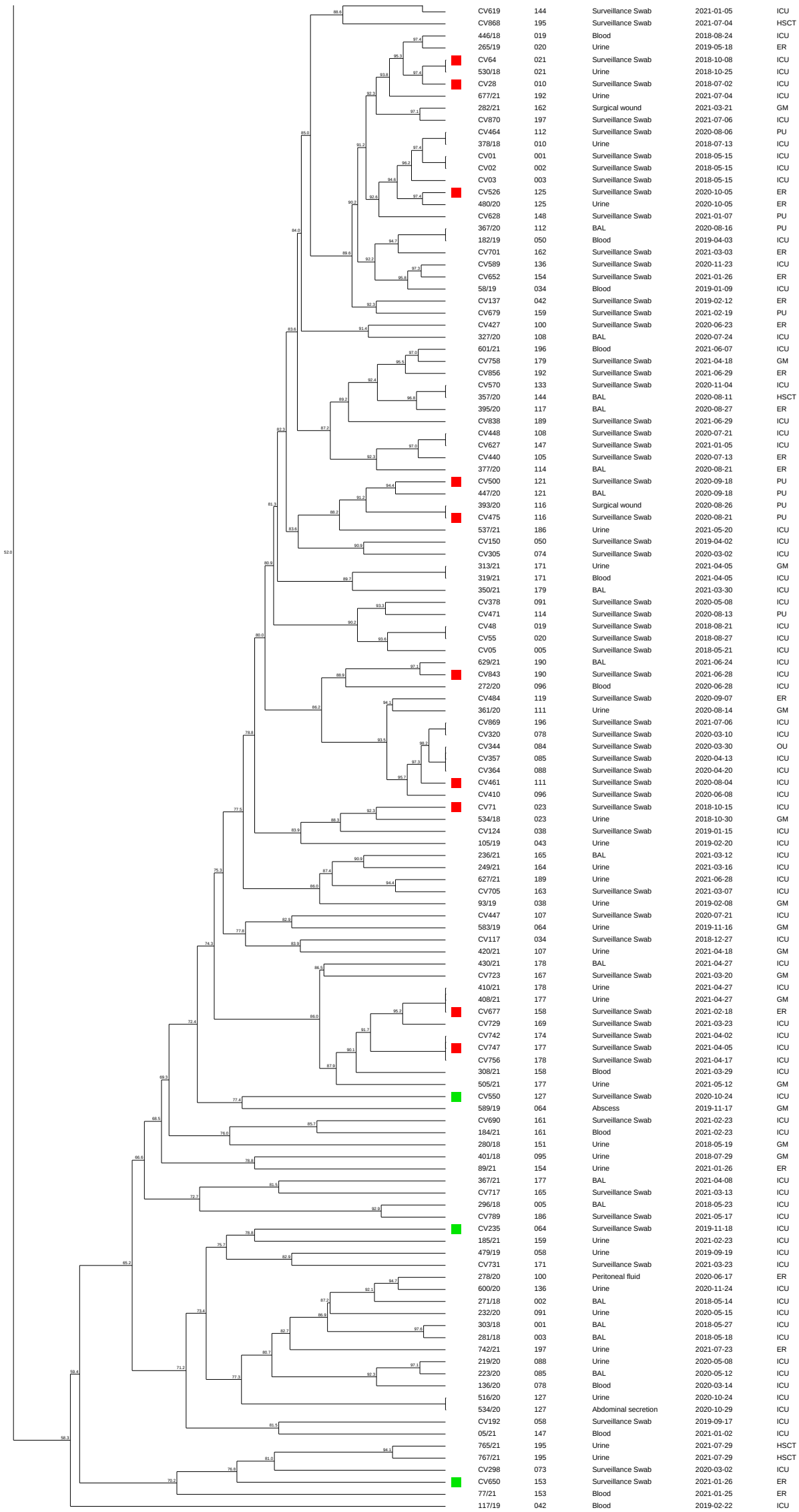
179. Martínez-Salazar JM, Salazar E, Encarnación S, Ramírez-Romero MA, Rivera J. Role of the extracytoplasmic function sigma factor RpoE4 in oxidative and osmotic stress responses in *Rhizobium etli*. *J Bacteriol*. 2009;191(13):4122–32.
180. Schroda M, Hemme D, Mühlhaus T. The *Chlamydomonas* heat stress response. *Plant J*. 2015;82(3):466–80.
181. Roberts JW, Yarnell W, Bartlett E, Guo J, Marr M, Ko DC, et al. Antitermination by bacteriophage λ Q protein. In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1998. p. 319–26.
182. Nudler E, Gottesman ME. Transcription termination and anti-termination in *E. coli*. *Genes to cells*. 2002;7(8):755–68.
183. Dudenhoeffer BR, Borggraefe J, Schweimer K, Knauer SH. NusA directly interacts with antitermination factor Q from phage λ . *Sci Rep*. 2020;10(1):6607.
184. Tomljenovic-Berube AM, Henriksbo B, Porwollik S, Cooper CA, Tuinema BR, McClelland M, et al. Mapping and regulation of genes within *Salmonella* pathogenicity island 12 that contribute to in vivo fitness of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infect Immun*. 2013;81(7):2394–404.
185. Nagy G, Danino V, Dobrindt U, Pallen M, Chaudhuri R, Emödy L, et al. Down-regulation of key virulence factors makes the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium rfaH mutant a promising live-attenuated vaccine candidate. *Infect Immun*. 2006;74(10):5914–25.
186. Li G, Shi J, Zhao Y, Xie Y, Tang Y, Jiang X, et al. Identification of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates using the string test in combination with *Galleria mellonella* infectivity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39:1673–9.
187. Zhang Q bin, Zhu P, Zhang S, Rong Y jing, Huang Z an, Sun L wan, et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* detection methods: a minireview. *Arch Microbiol*. 2023;205(10):326.
188. Soussan D, Salze M, Ledormand P, Sauvageot N, Boukerb A, Lesouhaitier O, et al. The NagY regulator: A member of the BglG/SacY antiterminator family conserved in *Enterococcus faecalis* and involved in virulence. *Front Microbiol*. 2023;13:1070116.
189. Dougherty MW, Valdés-Mas R, Wernke KM, Gharaibeh RZ, Yang Y, Brant JO, et al. The microbial genotoxin colibactin exacerbates mismatch repair mutations in colorectal tumors. *Neoplasia*. 2023;43:100918.
190. Thiry D, Passet V, Danis-Wlodarczyk K, Lood C, Wagemans J, De Sordi L, et al. New bacteriophages against emerging lineages ST23 and ST258 of *Klebsiella pneumoniae* and efficacy assessment in *Galleria mellonella* larvae. *Viruses*. 2019;11(5):411.
191. Andrade LN, Novais Â, Stegani LMM, Ferreira JC, Rodrigues C, Darini ALC, et al. Virulence genes, capsular and plasmid types of multidrug-resistant CTX-M (-2,-8,-15) and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from four major hospitals in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018;91(2):164–8.
192. De Campos TA, Gonçalves LF, Magalhães KG, de Paulo Martins V, Pappas Júnior GJ, Peirano G, et al. A fatal bacteremia caused by hypermucousviscous KPC-2 producing extensively drug-resistant K64-ST11 *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *Front Med*. 2018;5:265.

7 APÊNDICES

7.1 APÊNDICE A – Dendrograma construído de acordo com a tipagem por *Xba*I-PFGE, e características básicas (paciente, amostra clínica e data de isolamento, e unidade de internação do paciente) dos 374 isolados de Kp-KPC.







Dendrograma construído de acordo com a tipagem por *Xba*I-PFGE e as características genéticas dos 374 Kp-KPC. BAL = lavado broncoalveolar; ER = emergência; GM = enfermaria; ICU = unidade de terapia intensiva; PU = unidade pós-operatória; PC = unidade de cuidados paliativos; HSCT = unidade de transplante de células-tronco hematopoiéticas; OC = unidade oncológica. Quadrado verde: isolado pertencente ao grupo ONLYCOL; quadrado vermelho: isolado pertencente ao grupo COLINFEC.

7.2 Apêndice B – Dados clínicos e demográficos dos pacientes.

Paciente	Grupo	Unidade	Sexo	Raça	Idade	Transferência entre hospitais	Tempo em UTI	Comorbidade	Antibiótico prévio à coleta de vigilância	Desfecho da internação
22	COLINFEC	UTI	F	Branca	69	Não	18	Doença cardiovascular	ND	Melhorado
11	COLINFEC	UTI	F	Branca	35	Não	23	Sem comorbidades aparente	AMC+CEF+CLIND+AK+POL E	Melhorado
130	COLINFEC	UTI	M	Branca	73	Não	62	Doença cardiovascular	ND	Óbito
187	COLINFEC	UTI	F	Branca	38	Sim	41	Politraumas (sem comorbidades)	ND	Melhorado
120	COLINFEC	Emergência	M	Branca	76	Não	12	Doença cardiovascular e Intestinal	ND	Óbito
97	COLINFEC	Enfermaria	F	Branca	55	Sim	31	Doença neurológica	ND	Óbito
13	COLINFEC	UTI	M	Branca	64	Não	17	Doença cardiovascular e neurológica	ND	Melhorado
25	COLINFEC	UTI	M	Branca	55	Não	22	Doença cardiovascular	AMC+MER	Melhorado
146	COLINFEC	UTI	M	Branca	67	Não	24	Doença cardiovascular e diabetes	TAZO+MER	Melhorado
52	COLINFEC	UTI	M	Branca	62	Não	34	Doença cardiovascular	AMC+MER+VAN+GEN+POL E	Óbito
30	COLINFEC	UTI	F	Preta	44	Não	18	Doença cardiovascular e diabetes	VAN+MER+CRO+LEVO+VAN+POL E+	Óbito
35	COLINFEC	UTI	M	Branca	49	Não	20	Tumor cerebral	CEF+AMX+AK+POL E	Melhorado
26	COLINFEC	UTI	F	Branca	78	Não	31	Doença cardiovascular, doença renal e diabetes	CRO+MER+VAN	Óbito
185	COLINFEC	UTI	M	Branca	70	Sim	6	Doença cardiovascular e pulmonar	ND	Óbito
33	COLINFEC	UTI	F	Branca	70	Não	2	Doença pulmonar, cardiovascular e diabetes	MER+linezolida+CRO+claritromicina+TAZO	Melhorado
44	COLINFEC	TCTH	M	Branca	46	Não	5	Leucemia mielóide	ND	Óbito
104	COLINFEC	TCTH	M	Branca	33	Não	5	Leucemia mielóide	ND	Óbito
23	COLINFEC	UTI	F	Branca	67	Não	7	Doença cardiovascular e diabetes	ND	Óbito
121	COLINFEC	Pós operatório	M	Branca	79	Não	15	Doença cardiovascular	TAZO+POL E	Óbito
116	COLINFEC	Pós operatório	F	Branca	62	Não	43	Doença renal e hepatite B	ND	Óbito
21	COLINFEC	UTI	F	Parda	34	Não	54	Politraumas (sem comorbidades)	MER	Óbito
									ND	
									ND	
10	COLINFEC	UTI	F	Branca	53	Não	137	Doença cardiovascular e pulmonar	ND	Óbito
125	COLINFEC	Emergência	M	Branca	78	Sim	10	Doença cardiovascular e diabetes	ND	Melhorado
190	COLINFEC	UTI	M	Branca	75	Sim	36	Doença cardiovascular e diabetes	TAZO+VAN+MER+POL E + AK+LEVO	Óbito
111	COLINFEC	UTI	M	Branca	58	Sim	22	Doença cardiovascular, neurológica e pulmonar	TAZO	Melhorado
158	COLINFEC	Emergência	M	Branca	70	Sim	0	Doença pulmonar, neurológica e diabetes	ND	Melhorado
177	COLINFEC	UTI	F	Branca	83	Sim	13	Doença cardiovascular, pulmonar e diabetes	MER+TAZO	Melhorado
102	ONLYCOL	Emergência	F	Branca	72	Sim	16	Doença cardiovascular e obesidade	ND	Melhorado
117	ONLYCOL	Emergência	F	Branca	73	Não	12	Doença cardiovascular e obesidade	MER+AK	Óbito
39	ONLYCOL	UTI	F	Preta	71	Não	29	Doença cardiovascular, pulmonar, renal e diabetes	ND	Melhorado

Paciente	Grupo	Unidade	Sexo	Raça	Idade	Transferência entre hospitais	Tempo em UTI	Comorbidade	Antibiótico prévio à coleta de vigilância	Desfecho internação
172	ONLYCOL	TCTH	F	Branca	35	Não	0	Linfoma	MER+AK+POL B	Óbito
36	ONLYCOL	UTI	M	Branca	36	Não	63	sem comorbidades aparente	ND	Melhorado
45	ONLYCOL	UTI	M	Preta	58	Não	44	Doença cardiovascular e pulmonar	TAZO	Óbito
141	ONLYCOL	Emergência	M	Parda	59	Não	3	Doença cardiovascular e diabetes	ND	Melhorado
135	ONLYCOL	Emergência	M	Branca	66	Sim	19	Doença do trato gastrointestinal	ND	Óbito
48	ONLYCOL	UTI	M	Branca	63	Não	19	Doença cardiovascular	CLIN+CIP+GEN+POL E+AK	Óbito
47	ONLYCOL	UTI	M	Branca	65	Não	82	Doença cardiovascular	ND	Óbito
28	ONLYCOL	Emergência	F	Branca	68	Sim	ND	Doença cardiovascular	ND	Óbito
155	ONLYCOL	UTI	M	Branca	84	Não	30	Doença cardiovascular e Pulmonar	ND	Óbito
43	ONLYCOL	UTI	M	Branca	70	Não	25	Câncer de próstata	MER+VAN+CIP+CRO	Óbito
156	ONLYCOL	UTI	M	Branca	61	Sim	29	Hipotireoidismo	ND	Óbito
17	ONLYCOL	UTI	M	Branca	67	Não	14	sem comorbidades aparente	ND	Melhorado
151	ONLYCOL	UTI	F	Branca	13	ND	ND	Doença intestinal	PEN+FEP+AK	Permanece internada
79	ONLYCOL	TCTH	M	Branca	16	Não	0	Politraumas (sem comorbidades)	LEVO+bactrim+TAZO+MER+AK+POL E +neomicina	Óbito
66	ONLYCOL	UTI	M	Branca	73	Não	24	Transplante de fígado, doença cardiológica, pulmonar e diabetes	Imipenem+Ertapenem+TEICO+ POL B	Melhorado
14	ONLYCOL	UTI	M	Branca	83	Sim	5	Doença cardiovascular, renal e diabetes	ND	Óbito
67	ONLYCOL	UTI	M	Branca	58	Não	7	Doença cardiovascular	ND	Melhorado
127	ONLYCOL	UTI	F	Branca	71	Não	34	Doença cardiovascular	ND	Óbito
64	ONLYCOL	UTI	F	Branca	38	Não	3	Doença cardiovascular	CRO+AMP	Melhorado
153	ONLYCOL	Emergência	M	Preta	77	Sim	15	Doença cardiovascular	POL E+MER+VAN+AK	Óbito
95	ONLYCOL	UTI	M	Preta	55	Não	11	Doença cardiovascular e diabetes	Bactrim	melhorado

UTI = unidade de terapia intensiva; TCTH = unidade de transplante de células-tronco hematopoiéticas. AK = amicacina; AMC = amoxicilina/ácido clavulânico; AMX = amoxicilina; FEP = cefepima; CAZ = ceftazidima; CRO = ceftriaxona; CEF cefuroxima; CLIND = clindamicina; CIP = ciprofloxacina; GEN = gentamicina; MER = meropenem; LEVO = levofloxacina; PEN = penicilina; TEICO = teicoplanina; TAZO = piperacilina/tazobactam; POL B = polimixina B; POL E = polimixina E; SXT = sulfametoxazol/trimetoprima; VAN = vancomicina; ND = não determinado.

7.3 Apêndice C – Uso de dispositivo invasivo.

Paciente	Grupo	Uso de CVD	Uso de CVC	Uso de NPP	Necessidade de diálise	Uso de inotrópico	Uso de VMI
22	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
11	COLINFEC	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim
130	COLINFEC	Sim	Sim	Não	ND*	Sim	Sim
187	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
120	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
97	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
13	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
25	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
146	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
52	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
30	COLINFEC	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
35	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
26	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
185	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
33	COLINFEC	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
44	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não
104	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
23	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não
121	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
116	COLINFEC	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
21	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
10	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
125	COLINFEC	Não	Não	Não	Não	Não	Não
190	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
111	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
158	COLINFEC	Não	Não	Não	Não	Não	Não
177	COLINFEC	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
102	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
117	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
39	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
172	ONLYCOL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
36	ONLYCOL	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
45	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
141	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
135	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
48	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
47	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
28	ONLYCOL	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não
155	ONLYCOL	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
43	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
156	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
17	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
151	ONLYCOL	ND*	Sim	Sim	Não	ND*	Sim
79	ONLYCOL	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não
66	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
14	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
67	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não
127	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
64	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
153	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
95	ONLYCOL	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim

* ND = não definido. CVD = cateter vesical de demora; CVC = cateter venoso central; NPP = nutrição parenteral periférica; VMI = ventilação mecânica invasiva.

7.4 Apêndice D – Resultados de exames laboratoriais dos pacientes.

Paciente	Grupo	Hemoglobina ^a	Hemoglobina ^b	Leucócitos ^b	Leucócitos ^a	Plaquetas ^b	Plaquetas ^a	PCR ^b	PCR ^a	Creatinina ^b	Creatinina ^a	Albumina ^b	Albumina ^a
22	COLINFEC	8,6	7,2	4540	9680	243	181	1,75	8	1,75	3,5	2,64	ND*
11	COLINFEC	8,1	8,5	18820	13780	321	185	13,1	18,68	0,4	0,7	ND*	ND*
130	COLINFEC	8,4	6,9	10740	15800	254	242	9,37	25,9	1	1,6	2,7	ND*
187	COLINFEC	9,8	9,8	10780	10780	467	467	38,63	38,63	0,7	0,7	ND*	ND*
120	COLINFEC	10,2	10,2	62	112210	62	225	10,8	33	2,9	1,7	1,58	ND*
97	COLINFEC	12,6	ND*	8220	ND*	207	ND*	2,44	ND*	1,1	ND*	91,5	ND*
13	COLINFEC	7,7	8,9	9860	13070	217	230	4,04	17,91	3,6	3,2	3,34	3,38
25	COLINFEC	10,1	12,4	12670	13430	676	201	3,27	12,31	0,8	0,6	ND*	ND*
146	COLINFEC	8,1	7,2	12000	8150	236	281	3,98	21,89	3,8	ND*	ND*	ND*
52	COLINFEC	9,8	5,6	27080	16820	68	459	27,19	11,72	6,7	2,4	ND*	ND*
30	COLINFEC	8,2	7,1	21630	25130	139	250	21,28	22,84	2,2	1,7	1,25	ND*
35	COLINFEC	10,9	11,3	13220	15350	345	257	10,62	13,78	0,6	0,7	ND*	ND*
26	COLINFEC	6,7	6,7	17320	9190	89	109	10,21	7,57	2,4	2,7	ND*	ND*
185	COLINFEC	12	12	10210	10210	179	179	13,34	13,34	9,8	9,8	ND*	ND*
33	COLINFEC	11,5	11,1	13340	19000	219	228	3,65	8,53	1,3	2,1	ND*	ND*
44	COLINFEC	7,8	5,9	1380	10	33	5	1,64	28,03	0,9	1,1	3,48	3,63
104	COLINFEC	8,6	7,5	3900	1800	140	22	6,67	8,25	0,8	1,3	ND*	ND*
23	COLINFEC	9,8	6	10260	15750	186	300	1,44	33,93	3,6	2,1	ND*	ND*
121	COLINFEC	8,1	10,9	36100	13610	390	106	6,69	12,97	2	2,2	ND*	ND*
116	COLINFEC	8,5	9	17370	14810	338	210	23,75	45,2	1,2	1,6	ND*	ND*
21	COLINFEC	11,9	10	5910	14380	229	363	6,55	10,92	0,4	0,3	ND*	ND*
10	COLINFEC	6,8	7,7	11660	10290	27	130	5,81	8,2	0,7	0,9	ND*	3,4
125	COLINFEC	10,7	10,7	10550	10550	153	153	10,14	10,14	1,4	1,4	ND*	ND*
190	COLINFEC	8,9	6,7	23450	17660	271	255	27,03	20,31	4,1	3,3	ND*	ND*
111	COLINFEC	8,3	9	8490	12410	164	160	1,57	20,44	1,5	5,2	ND*	ND*
158	COLINFEC	12,6	10,6	12210	26330	161	98	0,73	2,48	0,7	0,5	ND*	ND*
177	COLINFEC	8,5	9,9	29940	31530	242	321	8,16	13,73	3,3	3,2	ND*	ND*
102	ONLYCOL	8,3	8,2	14160	7350	193	245	9,86	2,87	3,9	7,8	ND*	ND*
117	ONLYCOL	7,8	7,3	21880	20790	440	225	45,32	11,96	2,3	1,1	ND*	ND*
39	ONLYCOL	7,4	6,6	9030	5890	294	293	6,66	3,19	2,4	2,1	ND*	ND*
172	ONLYCOL	8,3	8,4	10	30	30	39	7,84	13,18	3,1	2,7	3,45	3,4
36	ONLYCOL	8,5	8,3	13840	9550	355	514	12,13	10,79	5,5	3,5	ND*	ND*
45	ONLYCOL	9,5	11,1	8340	12000	409	457	10,04	11	1	1,1	ND*	ND*
141	ONLYCOL	8,4	8,2	23550	11480	169	171	11,51	9,66	4,1	0,7	ND*	ND*
135	ONLYCOL	16,7	14,1	34670	21620	505	202	5,92	8,94	3,9	1,1	2,78	ND*
48	ONLYCOL	8,5	8,3	10630	9880	530	426	12,87	9,64	5,3	ND*	2,01	ND*
47	ONLYCOL	9	8,7	13070	29980	372	413	0,18	24,05	2,8	3,7	ND*	ND*
28	ONLYCOL	9,3	9,3	11520	11520	301	301	2,1	2,1	1,4	1,4	ND*	ND*
155	ONLYCOL	13,5	10,6	8550	16910	204	290	7,5	11,9	1,3	1,2	ND*	1,2
43	ONLYCOL	7,5	7,5	13090	13090	660	660	19,72	19,72	9,1	9,1	ND*	ND*

Paciente	Grupo	Hemoglobina ^a	Hemoglobina ^b	Leucócitos ^b	Leucócitos ^a	Plaquetas ^b	Plaquetas ^a	PCR ^b	PCR ^a	Creatinina ^b	Creatinina ^a	Albumina ^b	Albumina ^a
156	ONLYCOL	9,5	11,7	13070	23580	181	399	16,7	2,9	0,4	0,5	0,5	ND*
17	ONLYCOL	11,4	9,5	13170	8380	319	434	4,04	7,44	0,8	0,8	ND*	ND*
151	ONLYCOL	10,6	10,9	4350	15180	192	367	0,47	6,62	0,3	0,3	3,66	3,22
79	ONLYCOL	11,1	9,1	6340	1540	12	6	0,14	13,97	1,1	0,9	3,78	3,78
66	ONLYCOL	8,8	11,1	12670	8720	387	252	5,24	4,53	1,5	1	2,51	3,79
14	ONLYCOL	11,3	11,3	16030	16030	197	197	26,41	26,41	5	5	2,57	2,57
67	ONLYCOL	10,2	10,2	8390	8390	247	247	8,19	8,19	0,7	0,7	ND*	ND*
127	ONLYCOL	7	7	6130	6130	351	351	48,6	48,6	1,6	1,6	ND*	ND*
64	ONLYCOL	6,9	6,9	10790	10790	256	256	16,22	16,22	0,4	0,4	16,22	16,22
153	ONLYCOL	7,9	7,9	17290	17290	396	396	20,94	20,94	1,4	1,4	ND*	ND*
95	ONLYCOL	9	7,5	17130	18940	72	223	18,93	3,68	3,3	6	ND*	ND*

^a Exame coletado em até 48 horas antes ou depois da coleta do *swab* para cultura de vigilância.

^b Exame coletado em até 48 horas antes ou depois da amostra clínica de sítio de infecção.

*ND = não definido.

7.5 Apêndice E – Parâmetros de qualidade da montagem dos 51 genomas.

ID do isolado	Grupo	Contigs	Tamanho do genoma	Maior contig	N50	N90	GC (%)	L50	L90
CV28	COLINFEC	71	5644023	370124	226199	63650	56.99	10	29
CV31	COLINFEC	94	5555154	367524	176746	36903	57.15	11	35
CV33	COLINFEC	124	5573462	288714	110003	31806	57.09	17	51
CV36	ONLYCOL	91	5771724	580307	142654	34424	57.05	12	39
CV39	ONLYCOL	157	5588722	347802	75138	21158	57.58	23	75
CV64	COLINFEC	55	5561014	402302	254122	83056	57.24	9	22
CV70	COLINFEC	84	5619330	427574	188480	62998	57.08	11	29
CV71	COLINFEC	194	5651071	254588	68160	14502	57.12	21	88
CV80	COLINFEC	80	5841775	710959	225036	44298	57.03	9	30
CV93	COLINFEC	230	5818339	241847	86496	10387	57.03	21	87
CV99	ONLYCOL	130	5833730	277515	97126	24336	56.59	19	60
CV101	COLINFEC	111	6107428	650593	194973	36702	56.81	11	39
CV115	COLINFEC	152	6002732	329060	96283	21392	57.03	18	69
CV118	COLINFEC	81	5844027	525565	185790	44301	57.16	10	31
CV121	ONLYCOL	78	5508811	367234	185784	62317	57.25	11	30
CV128	ONLYCOL	305	5534573	199593	31474	8615	57.16	42	171
CV138	ONLYCOL	87	5628444	401360	247349	52375	57.23	10	26
CV139	COLINFEC	79	5631377	362101	182956	53892	56.55	12	31
CV142	ONLYCOL	230	5818339	241847	86496	10387	57.47	21	87
CV146	ONLYCOL	62	5352319	303112	180574	58423	57.03	12	33
CV148	ONLYCOL	218	5820693	218128	57882	12617	57.03	30	116
CV155	COLINFEC	168	5826372	229016	78012	17922	57.25	24	84
CV235	ONLYCOL	67	5557936	401641	222656	74687	57.08	10	26
CV244	ONLYCOL	120	5757976	320702	107373	22559	57.02	17	57
CV252	ONLYCOL	666	5698046	123240	15059	3374	57.17	101	429
CV324	ONLYCOL	73	5585493	461393	230911	53364	57.02	9	26
CV408	ONLYCOL	110	5803334	291586	111092	30295	57.30	17	51
CV413	COLINFEC	69	5559336	574561	217206	54197	56.65	9	27
CV434	ONLYCOL	117	5880186	354193	170421	36903	57.27	13	39
CV438	COLINFEC	43	5437742	694539	366320	86658	57.04	6	16
CV475	COLINFEC	85	5780303	421370	221826	44245	57.03	10	27
CV480	ONLYCOL	120	5821444	320406	125706	22864	57.32	15	54
CV486	COLINFEC	75	5548170	574372	186009	41416	57.04	10	30
CV500	COLINFEC	271	5735728	344830	53849	9257	57.04	28	135
CV526	COLINFEC	1509	4424302	23379	3249	1035	57.06	429	1481
CV550	COLINFEC	113	5756536	398257	172551	30059	57.24	11	37
CV558	COLINFEC	62	5546499	802201	234609	64285	57.13	7	23
CV585	ONLYCOL	86	5589068	507600	148465	37796	57.16	11	37
CV611	ONLYCOL	126	5669461	288708	173006	31825	57.03	13	38
CV623	COLINFEC	129	5829951	240516	101713	22027	57.22	19	61
CV637	ONLYCOL	170	5553755	371613	92141	15644	56.98	17	70

ID do isolado	Grupo	Contigs	Tamanho do genoma	Maior contig	N50	N90	GC (%)	L50	L90
CV650	ONLYCOL	82	5694876	472287	186507	45821	56.99	10	31
CV654	ONLYCOL	123	5699347	518019	134862	26194	57.35	13	46
CV658	ONLYCOL	80	5235937	316501	143987	34468	57.06	13	41
CV677	COLINFEC	87	5754937	479353	221671	38573	57.30	10	27
CV733	ONLYCOL	134	5532468	288443	97390	24680	57.06	18	63
CV747	COLINFEC	104	5755877	479601	213521	52375	56.99	10	28
CV770	COLINFEC	125	5756394	334880	142227	30757	56.99	14	42
CV797	COLINFEC	109	5756432	398257	172551	30059	56.99	11	37
CV843	COLINFEC	89	5754852	479353	221671	38573	57.06	10	27

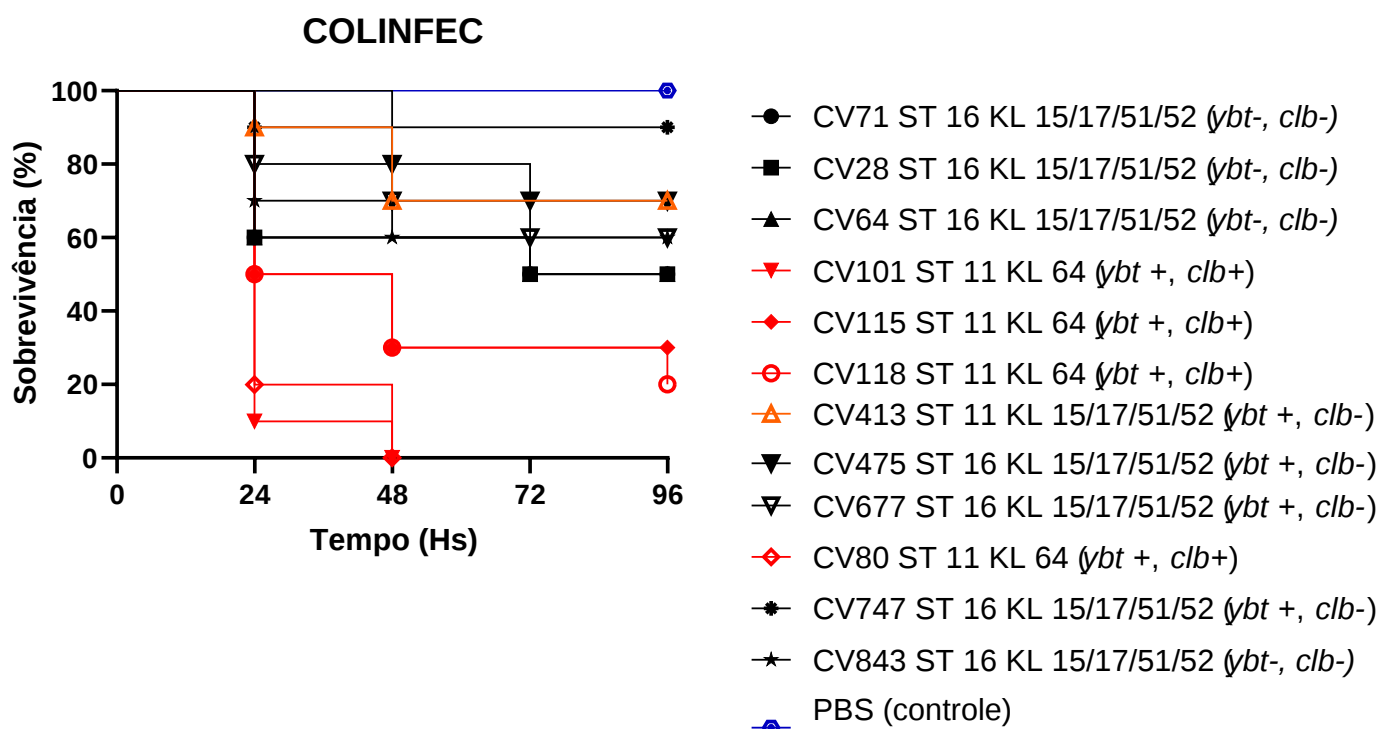
Contigs: Número de contigs com comprimento maior ou igual a 1.000 bp. Tamanho do genoma (≥ 1.000 bp): comprimento total de todas as sequências, incluindo contigs com comprimento maior ou igual a 1000 bp. Maior contig (bp): comprimento do maior contig, ou seja, a sequência contígua mais longa no genoma. N50: tamanho do contig em que, se todos os contigs fossem alinhados em ordem decrescente de tamanho, a primeira metade do genoma seria representada. N90: tamanho do contig em que, se todos os contigs fossem alinhados em ordem decrescente de tamanho, os primeiros 90% do genoma seriam representados. GC (%): porcentagem de bases nitrogenadas no genoma que são guanina (G) ou citosina (C). L50: número de contigs necessários para representar metade do genoma (em ordem decrescente de tamanho). L90: número de contigs necessários para representar 90% do genoma (em ordem decrescente de tamanho).

7.6 APÊNDICE F – Anotações gênicas que contrastaram entre os grupos.

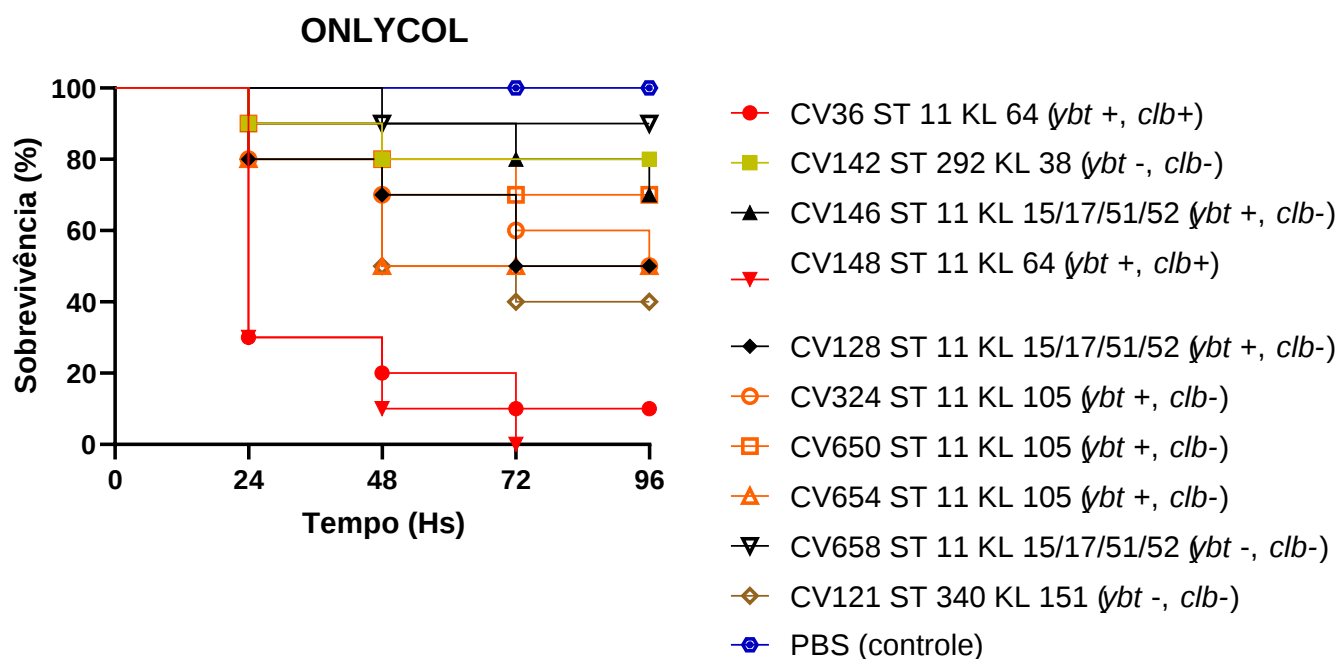
Locus	Roary	Uniprot	InterPRO	COLINFEC	ONLYCOL	Especificidade	Fisher p valor
group_5412	Proteína hipotética	Uncharacterized protein	Uncharacterized protein	11	1	95,8	0,002
group_4747	Proteína hipotética	Phospholipase D	Phospholipase D	26	15	96,2	0,003
group_4792	Transposase da família IS5	IS5 family transposase	IS5 family transposase	19	7	70,8	0,005
group_4722	Proteína de antiterminação Q	Proteína de antiterminação Q	Proteína de antiterminação Q	10	1	95	0,005
group_4745	Transposase da família ISNCY ISLad2	Mobile element protein	Transposase da família ISNCY ISLad2	25	14	92,2	0,006
group_1041	Proteína hipotética	Maltoporina (<i>lamB</i>)	Maltoporina(<i>lamB</i>)	2	10	69,2	0,006
arsH	FMN redutase dependente de NADPH	FMN redutase dependente de NADPH	FMN redutase dependente de NADPH	0	6	70,2	0,006
nhaA_2	Antitransportador Na(+)/H(+) NhaA	Antitransportador Na(+)/H(+) NhaA	Antitransportador Na(+)/H(+) NhaA	0	6	75,0	0,006
group_7531	Arseniato redutase	Arseniato redutase	Arseniato redutase	0	6	75,0	0,006
group_7532	Proteína de membrana da bomba de arsênio	Proteína de membrana da bomba de arsênio	Proteína de membrana da bomba de arsênio	0	6	75,0	0,006
			Regulador transcricional de resistência ao arsênio				
arsR2	Regulador transcricional de resistência ao arsênio ArsR2	Regulador transcricional de resistência ao arsênio ArsR2	ArsR2	0	6	75,0	0,006
			Transportador de ânions inorgânicos da família SulP				
sulP_1	Transportador de ânions inorgânicos da família SulP	Transportador de ânions inorgânicos da família SulP	família SulP	0	6	75,0	0,006
group_7535	Proteína hipotética	Proteína universal do estresse (MFS)	Proteína universal do estresse (MFS)	0	6	75,0	0,006
group_7536	Proteína hipotética	Transportador facilitador principal	Transportador facilitador principal	0	6	75,0	0,006
crcB_2	Transportador de íons de fluoreto CrcB	Transportador de íons de fluoreto CrcB	Transportador de íons de fluoreto CrcB	0	6	70,1	0,006
htpX_2	Protease HtpX	Protease HtpX	Protease HtpX	26	16	96,6	0,008
ibpA_2	Proteína de choque térmico pequena IbpA	Proteína de choque térmico pequena IbpA	Proteína de choque térmico pequena IbpA	26	16	96,6	0,008

Somente foram consideradas anotações gênicas que apresentaram diferença significativa entre os grupos considerando o valor de $p < 0.01$. Em vermelho: anotações gênicas associadas ao grupo COLINFEC. Em azul: anotações gênicas associadas ao grupo ONLYCOL.

7.7 Apêndice G – Sobrevivência em modelo de infecção em larvas de *Galleria mellonella* após o desafio com representantes do grupo COLINFEC.

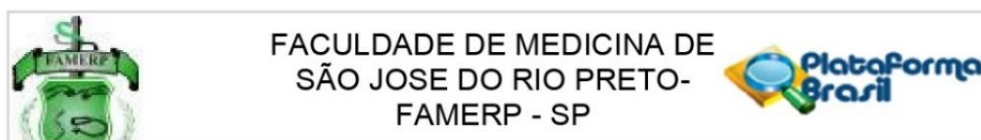


7.8 Apêndice H – Sobrevivência em modelo de infecção em larvas de *Galleria mellonella* após o desafio com representantes do grupo ONLYCOL.



8 ANEXOS

ANEXO I – Aprovação do estudo por Comitê de Ética em Pesquisa.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização clínica, epidemiológica e molecular de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos em pacientes admitidos em um hospital terciário do Estado de São Paulo

Pesquisador: Tiago Casella

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 52157921.3.0000.5415

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- FAMERP - SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.039.806

Apresentação do Projeto:

Introdução

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria Gram-negativa, em formato de bastonete, que pode ser encontrada em, praticamente, qualquer ambiente, como solo, água, plantas e animais. Em humanos, é parte da microbiota normal do nariz, da boca e trato gastrointestinal (ARATO et al., 2021). Esta espécie é oportunista e afeta, principalmente, pacientes imunocomprometidos, especialmente crianças e idosos (ARATO et al., 2021). Além disso, está associada à múltipla resistência aos antibióticos, inclusive aos considerados de última opção terapêutica, como é o caso dos carbapenêmicos (MARTIN; BACHMAN, 2018). Globalmente, *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos (KpRC) representam uma das maiores ameaças à saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou o patógeno como prioridade crítica, requerendo pesquisas para o desenvolvimento de novas terapias eficazes para o seu combate (TACCONELLI et al., 2018). Porém, um número limitado de antibióticos está sendo desenvolvido atualmente, enquanto os mecanismos de resistência aos antibióticos permanecem crescendo desproporcionalmente. Neste contexto, o

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416

Bairro: VILA SAO PEDRO

CEP: 15.090-000

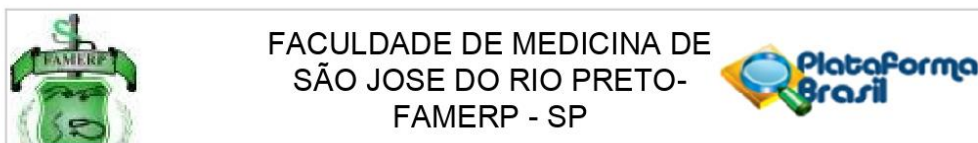
UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)3201-5813

Fax: (17)3201-5813

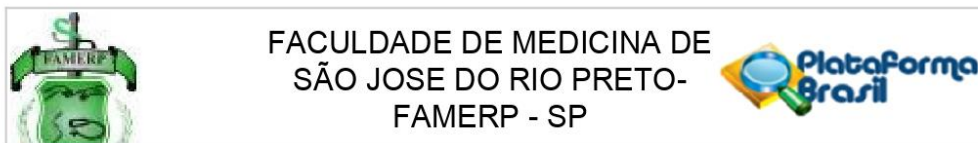
E-mail: cepfamerp@famerp.br



Continuação do Parecer: 5.039.806

uso racional de antibióticos vem sendo constantemente discutido (AIRES et al., 2020). A resistência aos carbapenêmicos pode ocorrer por múltiplos mecanismos, incluindo alteração da permeabilidade da membrana externa mediada pela perda de porinas, super expressão de bombas de efluxo, e, mais comumente, por produção de enzimas conhecidas como carbapenemases (TSIOUTIS; EICHEL; MUTTERS, 2021). Dentre os tipos de carbapenemases relatadas em todo o mundo, as mais recorrentes são a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), as oxacilinases do tipo 48 (OXA-48), e a Nova Delhi metalo-lactamase (NDM) (TIAN et al., 2018). Estudos têm demonstrado que a enzima KPC representa o tipo mais comum dentre as carbapenemases produzidas por *K. pneumoniae*, com alta transmissão entre ambientes hospitalares, inclusive no Brasil (HAWKEY, 2015; RAMOS-CASTAÑEDA et al., 2018). No entanto, a ocorrência pode variar geograficamente (ZHU et al., 2016). A investigação epidemiológica das classes de carbapenemases é de extrema importância, visto que o tipo da enzima carregado pode influenciar no tipo de tratamento empregado para sanar a infecção (YAHAV et al., 2020). Além disso, as carbapenemases, geralmente, estão associadas a elementos genéticos móveis que podem ser compartilhados para outros patógenos, como plasmídeos e transposons (LEE et al., 2016), o que aumenta a sua distribuição em uma localidade. Neste contexto, aparecem as infecções associadas à assistência à saúde (IRAS). Uma fração considerável das IRAS está associada à microbiota normal de cada paciente. Outra parte importante se refere aos pacientes em estado crítico, que necessitam de terapias prolongadas com antimicrobianos, que podem ser colonizados por outras bactérias do ambiente hospitalar e, conseqüentemente, desenvolver uma infecção (TOLERA et al., 2018). Além disso, devido à alta pressão seletiva do ambiente assistencial, muitos pacientes acabam atuando como reservatórios de microrganismos, patogênicos ou não, portadores de genes de resistência aos principais antimicrobianos utilizados (AGABA et al., 2017). Conseqüentemente, esses genes de resistência são transferidos a outras bactérias que, então, causarão processos infecciosos de difícil tratamento em uma variedade de pacientes, críticos ou não, aumentando os riscos de mortalidade e

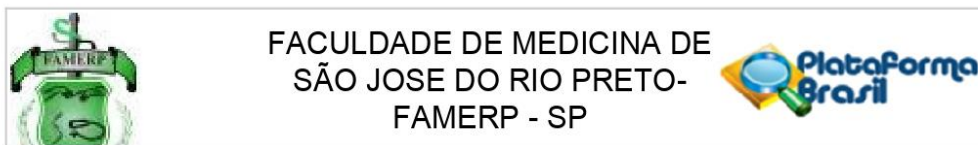
Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416
Bairro: VILA SAO PEDRO **CEP:** 15.090-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 **Fax:** (17)3201-5813 **E-mail:** cepfamerp@famerp.br



Continuação do Parecer: 5.039.806

morbidade. O Hospital de Base de São José do Rio Preto (HB) é um hospital-escola de nível terciário, ligado à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Juntamente com o Hospital da Criança e Maternidade (HCM), são parte do complexo hospitalar Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto (FUNFARME). O complexo presta atendimento de alta complexidade, sendo referência para mais de 2 milhões de habitantes dos 102 municípios pertencentes à Divisão Regional de Saúde de Rio Preto (DRS-15). Para tal, conta, atualmente, com 914 leitos de enfermagem, 188 leitos de UTI, 32 salas cirúrgicas, 4 salas no centro obstétrico e 2 salas cirúrgicas na oftalmologia. Além disso, mais de 1,3 milhão de exames laboratoriais, quase 800 mil atendimentos, e mais de 43 mil cirurgias são realizados anualmente em todo o complexo FUNFARME (<https://www.hospitaldebase.com.br/funfarme-em-numeros>). Diante destes importantes números, a ocorrência de IRAS é inevitável. Dentre os principais patógenos responsáveis por infecções nosocomiais, KpRC está entre as espécies mais ocorrentes no complexo FUNFARME. De acordo com o Setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do complexo (Micro-LC/HB), em torno de 650 isolados de KpRC são obtidos de pacientes admitidos no complexo anualmente, com tendência ascendente (Figura 1). Entretanto, houve um aumento considerável de isolados de KpRC no último ano, provavelmente, devido ao agravamento de admissões decorrentes da COVID-19, onde mais de 800 foram obtidos somente até agosto de 2021. Isso sugere uma possível quebra de barreira, facilitando a dispersão de linhagens específicas em determinadas unidades de internação e pacientes. Considerando que a FUNFARME representa um dos maiores e mais importantes complexos hospitalares do Estado de São Paulo, é imprescindível conhecer e monitorar a diversidade das *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos responsáveis por IRAS nos pacientes admitidos na instituição. Além disso, identificar as características dos pacientes que possam estar associadas ao desenvolvimento das infecções é essencial na tentativa de barrar ou, ao menos, diminuir a ocorrência desse patógeno. As informações adquiridas ao final do estudo fornecerão dados para auxiliar a equipe da Comissão de Controle de Infecções Hospitalares no desenvolvimento de estratégias

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416
Bairro: VILA SÃO PEDRO **CEP:** 15.090-000
UF: SP **Município:** SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 **Fax:** (17)3201-5813 **E-mail:** cepfamerp@famerp.br



Continuação do Parecer: 5.039.806

de manejo e tratamento, de forma a aumentar a segurança e melhorar o prognóstico dos pacientes.
Metodologia Proposta:

O estudo será conduzido no CIM/FAMERP. Isolados de KpRC obtidos a partir de amostras clínicas de pacientes internados no complexo

FUNFARME a partir de janeiro de 2016 a dezembro de 2021 farão parte do estudo. As amostras foram coletadas a pedido do médico responsável

por cada paciente, como procedimento padrão para a determinação de infecção e colonização bacteriana nos mesmos. Os isolados

(aproximadamente 4.000) encontram-se conservados no Micro-LC/HB, e serão enviados ao CIM/FAMERP após aprovação pelo CEP/FAMERP para

a realização dos experimentos laboratoriais. Serão incluídos no estudo os pacientes dos quais for obtido um isolado de KpRC, sem a respectiva

identificação pessoal. Para fins de caracterização da população atingida, bem como da evolução dos pacientes e das coinfeções bacterianas, serão

coletados os seguintes dados a partir dos prontuários eletrônicos: idade, gênero, data de nascimento, cidade de origem, data de admissão no

complexo FUNFARME, data de admissão em UTI, presença de comorbidades, material clínico coletado, data da coleta do material clínico,

identificação da espécie da bactéria isolada, resultado do TSA, local de internação do paciente no momento da coleta da amostra clínica, se houve

coleta de material clínico anteriormente ao do isolado em questão, antimicrobianos administrados ao paciente anteriormente à coleta da amostra

clínica e os administrados após a identificação da KpRC, data de alta de UTI, data da alta hospitalar, e desfecho da infecção. O DNA bacteriano

será obtido pela técnica de lise térmica, e será armazenado a -20 °C até a sua utilização na investigação dos principais genes associados à

produção de carbapenemase em KpRC, bem como os genes associados à virulência em K. pneumoniae. Os primers estão listados na Tabela 1. A

tipagem por restrição genômica dos isolados de K. pneumoniae confirmados como produtores de carbapenemase por PCR será realizada com a

endonuclease XbaI seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE). O protocolo será realizado de acordo com recomendações descritas

previamente (HAN et al., 2013). O programa BioNumerics será utilizado para a construção do

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416

Bairro: VILA SAO PEDRO

CEP: 15.090-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)3201-5813

Fax: (17)3201-5813

E-mail: cepfamerp@famerp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-
FAMERP - SP



Continuação do Parecer: 5.039.806

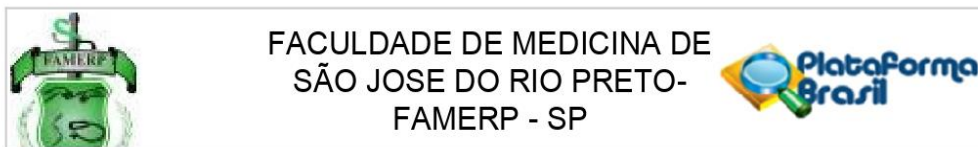
dendrogramas e agrupamento dos isolados com base no coeficiente de similaridade de Dice e no UPGMA. Isolados que apresentarem perfil de similaridade 90% serão considerados como pertencentes a um mesmo grupo. A tipagem por Multilocus Sequence Typing (MLST) será realizada de acordo com protocolo previamente padronizado (DIANCOURT et al., 2005). A determinação das linhagens ST dos isolados será realizada por comparação com as linhagens já disponíveis no website do Instituto Pasteur (<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). Como esse procedimento é extremamente custoso devido ao sequenciamento de DNA, a MLST deverá ser realizada em 2,5% (aproximadamente, 100) dos isolados de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase. Será realizada conjugação usando as linhagens *E. coli* J53 ou *E. coli* C600 como cepas receptoras. Os isolados contendo os genes que codificam carbapenemase serão utilizados como cepas doadoras. As transconjugantes serão selecionadas em ágar LB com meropenem (2 µg/mL) e azida sódica (100 µg/mL) ou estreptomicina (200 µg/mL), de acordo com a marca de seleção de cada cepa receptora. As possíveis transconjugantes terão seu DNA extraído para a confirmação da presença do respectivo gene de carbapenemase por PCR. Para determinar o tamanho dos plasmídeos que carregam o gene de carbapenemase, será preparado bloco de agarose com a transconjugante, de acordo com protocolo padronizado pelo PulseNet. Os blocos de agarose serão digeridos com a enzima de restrição S1, seguida de PFGE. Quando não for possível obter o plasmídeo isolado por conjugação, a confirmação do mesmo será realizada por Southern blot/hibridação. O blotting será realizado no gel de agarose obtido da S1-PFGE por metodologia de capilaridade durante 24 horas. A hibridação será realizada com sondas específicas e o kit da Roche Diagnostics.

Metodologia de Análise de Dados:

Todas as informações coletadas sobre os pacientes e sobre os isolados bacterianos serão inseridas em uma planilha de dados no programa Microsoft Office Excel para descrição das respectivas características, bem como para a criação de gráficos explicativos.

Os resultados da tipagem por restrição genômica com endonuclease seguida de PFGE serão

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416
Bairro: VILA SÃO PEDRO **CEP:** 15.090-000
UF: SP **Município:** SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 **Fax:** (17)3201-5813 **E-mail:** cepfamerp@famerp.br



Continuação do Parecer: 5.039.806

inseridos no programa BioNumerics (Applied Maths/bioMérieux) para observação dos padrões de bandas e construção dos dendrogramas.

As sequências de nucleotídeo dos genes resultantes da tipagem por MLST serão submetidas no site <https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html> para acesso e comparação dos resultados com o banco de dados.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar os isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase obtidos de pacientes admitidos no complexo FUNFARME, e conhecer as características clínicas e demográficas dos respectivos pacientes.

Objetivo Secundário:

- caracterizar os isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos quanto à produção de carbapenemase obtidas a partir de sítios de infecções e de swab de vigilância de pacientes admitidos no complexo FUNFARME;
- identificar as características clínicas e demográficas de pacientes dos quais foram obtidos os isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos a partir da análise de prontuários médicos eletrônicos;
- traçar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados;
- identificar a plataforma genética de mobilização dos genes responsáveis pela produção de carbapenemase detectados;
- detectar os genes associados à virulência nos isolados produtores de carbapenemase;
- identificar a ocorrência de transmissão de cepas produtoras de carbapenemase entre os pacientes admitidos no complexo FUNFARME.

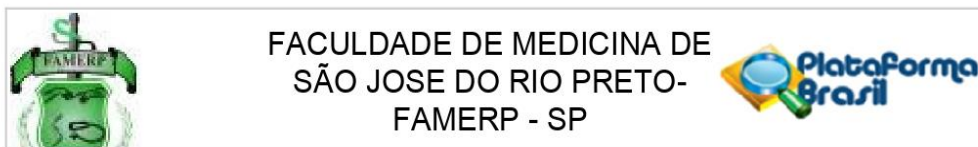
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não haverá riscos para qualquer paciente, uma vez que as bactérias utilizadas neste estudo já são as mesmas isoladas dos pacientes internados a partir de exames de rotina para a verificação das condições clínicas e infecciosas nos mesmos. Quanto aos manipuladores das bactérias, durante o desenvolvimento desse estudo no CIM/FAMERP, os riscos são mínimos uma vez que as bactérias são manipuladas em capela de biossegurança similar à utilizada no laboratório clínico do hospital onde são isolados os respectivos microrganismos.

Outro ponto a ser clarificado é quanto ao possível risco da quebra do sigilo de informações

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416
Bairro: VILA SAO PEDRO **CEP:** 15.090-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 **Fax:** (17)3201-5813 **E-mail:** cepfamerp@famerp.br



Continuação do Parecer: 5.039.806

personais e confidenciais dos pacientes quando da consulta de prontuários para a obtenção de informações que auxiliem na caracterização dos perfis clínicos e demográficos. Apesar de o presente não se configurar como um estudo clínico, e sim, de caráter laboratorial, segundo a Resolução nº 466 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012, "existe risco em toda pesquisa que envolve seres humanos". Para minimizar esse risco, as informações serão disponibilizadas em uma planilha eletrônica em códigos numerais, de tal forma que qualquer integrante da pesquisa não tenha acesso a tais dados, com exceção do único participante encarregado por esta etapa do estudo. Em momento algum haverá inclusão do nome do paciente ou quaisquer outras informações pessoais que permitam sua identificação por outrem. Cada isolado de KpRC receberá um código exclusivo, sem qualquer relação com as informações dos pacientes disponíveis nos prontuários, que será utilizado como identificação daquele isolado.

Benefícios:

Conhecer as características de resistência e de virulência de um patógeno tão importante quanto *K. pneumoniae* produtor de carbapenemase será fundamental para a CCIH planejar estratégias de manejo e tratamento que visem mitigar os casos de infecção na instituição, aumentando a segurança e melhorando o prognóstico dos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Será realizada coleta de dados de prontuário eletrônico para caracterizar o paciente quanto a clínica e demográficas, com as *Klebsiella pneumoniae* dos KpCR desses pacientes serão feitas análises moleculares para identificar a plataforma genética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Atende a resolução 466/12.

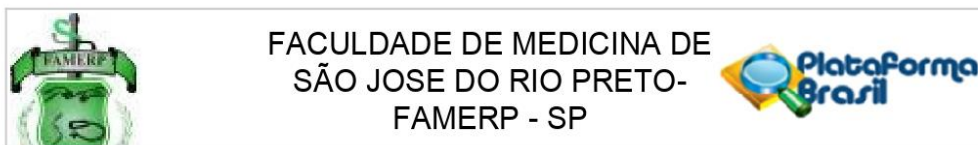
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012, Resolução nº 510 de 2016 e Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa.

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416
Bairro: VILA SÃO PEDRO **CEP:** 15.090-000
UF: SP **Município:** SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 **Fax:** (17)3201-5813 **E-mail:** cepfamerp@famerp.br



Continuação do Parecer: 5.039.806

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1826698.pdf	28/09/2021 15:57:29		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_CEPassinada.pdf	28/09/2021 15:57:03	Tiago Casella	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Infraestrutura_FAMERP_FUNFARME_KpRCassinada.pdf	28/09/2021 15:55:16	Tiago Casella	Aceito
Outros	InstrumentoColetaDados_KpRC.docx	15/09/2021 15:49:40	Tiago Casella	Aceito
Outros	PRIMERS_Tabela1.xlsx	15/09/2021 15:42:06	Tiago Casella	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Kleb_CEP.docx	15/09/2021 15:41:42	Tiago Casella	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DO RIO PRETO, 15 de Outubro de 2021

Assinado por:
BEATRIZ BARCO TAVARES JONTAZ IRIGOYEN
 (Coordenador(a))

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416
Bairro: VILA SAO PEDRO **CEP:** 15.090-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 **Fax:** (17)3201-5813 **E-mail:** cepfamerp@famerp.br

ANEXO II – Trabalhos publicados durante o Doutorado.

MICROBIAL DRUG RESISTANCE
Volume 27, Number 8, 2021
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/mdr.2020.0488

Potentially Pathogenic Multidrug-Resistant *Escherichia coli* in Lamb Meat

Katia Suemi Gozi,^{1,*} Luana Perpetua Tobias Deus Ajude,^{1,*} Marlon do Valle Barroso,¹
Caroline Rodrigues da Silva,¹ Juliana Regina Peiró,² Luiz Claudio Nogueira Mendes,²
Mara Corrêa Lelles Nogueira,¹ and Tiago Casella,^{1,3}

Extended-spectrum cephalosporin (ESC) resistance remains a threat since ESC are important antimicrobials used to treat infections in humans and animals. *Escherichia coli* is an important source of ESC-resistance genes, such as those encoding extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). *E. coli* is a common commensal of lambs. Reports that contaminated food can be a source of ESC-resistant bacteria in humans and that ESBL-producing *E. coli* are found in sheep in Brazil led us to survey their presence in retail lamb meat. Twenty-five samples intended for human consumption were screened for ESC-resistant *E. coli*, and the isolates were characterized. IncI1-*bla*_{CTX-M-8} and IncHI2-*bla*_{CTX-M-2} were the main plasmids responsible for ESC resistance. The plasmids harbored common ESBL genes in Enterobacteriaceae from food-producing animals in Brazil. IncI1-*bla*_{CTX-M-14} and IncF-*bla*_{CTX-M-55} plasmids, associated with human infections, were also detected. Few CTX-M-producing *E. coli* have been clustered by typing methods, and some may be genetically pathogenic. The findings indicate the presence of diverse strains of *E. coli*, harboring important ESBL genes, in lamb meat in Brazil. Surveillance of ESC-resistant bacteria could reduce the spread of antimicrobial resistance through the food chain.

Keywords: antimicrobial resistance, CTX-M, Enterobacteriaceae, food-production chain, Brazil

Introduction

ANTIMICROBIAL-RESISTANT (AR) pathogens compromise the treatment of bacterial infections, especially, in humans.^{1–5} The potential link between the misuse of antimicrobials in food-producing animals and the emergence of resistant pathogens in humans has encouraged surveillance of AR worldwide.⁶ Human exposure to AR *Escherichia coli* through handling and consumption of contaminated food may contribute to the spread of AR determinants.^{2,7,8} During the slaughter of food-producing animals, the carcass may be contaminated by AR commensal bacteria, which might reach humans through the food chain.^{7,9–12}

Monitoring of commensal bacteria is important because they constitute reservoirs of AR genes, which allows tracking of emerging resistance in livestock and possible spread through animal-derived food.¹³ These microorganisms are a public health concern since they are disseminated globally and cause treatment failure.^{14,15}

Extended-spectrum cephalosporins (ESCs) are among the few available therapies for serious global Enterobacteriaceae infections in both humans and animals. The use of ESC can

cause selection of resistant bacteria in animals. Thus, ESC have the highest priority and are critically important antimicrobials in human and veterinary medicine.^{16,17}

Treatment with β -lactam antimicrobials select for bacteria that produce extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and/or bacteria that are resistant to other antimicrobials due to coselection.^{18–22} CTX-M enzymes are the most prevalent ESBL in enterobacterial representatives isolated from clinical samples, food-producing animals, and the environment in Brazil.^{23–28} These enzymes, promote an important resistance phenotype to ESC. However, evidence from several studies argues against the role of animals in the dissemination of AR bacteria from food-production chains to humans.^{29,30} The resulting ambiguity surrounding the involvement of animals in this dissemination demands further study. Determining whether meat consumed by humans harbors AR bacteria is vital because foodstuff is the final and direct link between food-producing animals and humans.

In general, the majority of studies on ESBL-producing bacteria recovered from meat have been conducted on beef, pork, and chicken meat. Information for other meat, such as lamb meat, is lacking in countries including Brazil, where

¹Centro de Investigação de Microrganismos, FAMERP, São José do Rio Preto, Brazil.

²Faculdade de Medicina Veterinária, São Paulo State University (UNESP), Araçatuba, Brazil.

³Hospital de Base de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, Brazil.

*These two authors contributed equally to this work.



Genomic analysis of *Escherichia coli* circulating in the Brazilian poultry sector

Caroline Rodrigues da Silva¹ · Marlon do Valle Barroso¹ · Katia Suemi Gozi¹ · Herrison Fontana² · Mara Corrêa Lelles Nogueira¹ · Nilton Lincopan^{2,3} · Tiago Casella^{1,4}

Received: 24 May 2022 / Accepted: 12 July 2022

© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Microbiologia 2022

Abstract

Escherichia coli are gut commensal bacteria and opportunistic pathogens, and the emergence of antimicrobial resistance threatens the safety of the food chain. To know the *E. coli* strains circulating in the Brazilian poultry sector is important since the country corresponds to a significant chicken meat production. Thus, we analyzed 90 publicly genomes available in a database using web-based tools. Genomic analysis revealed that *sul* alleles were the most detected resistance genes, followed by *aadA*, *bla*_{CTX-M}, and *dfrA*. Plasmids of the IncF family were important, followed by IncI1- α , Col-like, and pO111. Genes of specific metabolic pathways that contribute to virulence (*terC* and *gad*) were predominant, followed by *sitA*, *traT*, and *iss*. Additionally, *pap*, *usp*, *vat*, *sfa/foc*, *ibeA*, *cnf1*, *eae*, and *sat* were also predicted. In this regard, 11 *E. coli* were characterized as avian pathogenic *E. coli* and one as atypical enteropathogenic *E. coli*. Phylogenetic analysis confirmed the predominant occurrence of B1 but also A, D, B2, F, E, G, C, and Clade I phylogroups, whereas international clones ST38, ST73, ST117, ST155, and ST224 were predicted among 53 different sequence types identified. Serotypes O6:H1 and:H25 were prevalent, and *fimH31* and *fimH32* were the most representatives among the 36 FimH types detected. Finally, single nucleotide polymorphisms-based phylogenetic analysis confirmed high genomic diversity among *E. coli* strains. While international *E. coli* clones have adapted to the Brazilian poultry sector, the virulome background of these strains support a pathogenic potential to humans and animals, with lineages carrying resistance genes that can lead to hard-to-treat infections.

Keywords Food-producing animals · Antimicrobial resistance · Virulence · WGS

Introduction

Pathogenic bacteria represent a significant threat to public health, especially those causing hard-to-treat infections due to antimicrobial resistance [1]. *Escherichia coli* is one of the most studied microorganism since it is part of the gastrointestinal microbiota of humans and animals and is also a frequent cause of significant infections [2, 3]. The discrimination between pathogenic and commensal *E. coli* strains is sometimes hard to achieve since the virulence of the first is suggested as a derivative of the commensal lifestyle, but both lineages differ with regard to their set of virulence factors [4]. Additionally, antimicrobial resistance genes are found in both commensal and pathogenic bacteria isolated from humans and animals due to their great capacity to acquire and accumulate antimicrobial resistance genes [5, 6].

All this exposed brings light to the One Health debate and the role of both humans and animals in the persistence and transmission of bacteria and genes. In recent years, the

Responsible Editor: Tânia A. Tardelli Gomes

✉ Tiago Casella
tiago_casella@yahoo.com.br

- ¹ Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José Do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, Bloco U-6, São José Do Rio Preto, SP CEP: 15090-000, Brazil
- ² Departamento de Análises Clínicas E Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
- ³ Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
- ⁴ Hospital de Base, São José Do Rio Preto, SP, Brazil

Published online: 21 July 2022

Springer



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Original Article

Characterization of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and affected patients of a pediatric hospital in Brazil

Marlon do Valle Barroso^a, Caroline R. da Silva^a, Luisa R. Benfatti^a, Katia S. Gozi^a,
Letícia K. de Andrade^a, Leonardo N. Andrade^b, Cássia F. Estofolete^{a,c}, Mara C.L. Nogueira^a,
Tiago Casella^{a,c,*}

^a Centro de Investigação de Microrganismos, FAMERP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil^b Laboratório de Pesquisa em Resistência e Virulência Bacteriana, FCFRP-USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil^c Hospital de Base de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2022

Revised in revised form 14 February 2023

Accepted 28 February 2023

Available online 4 March 2023

Keywords:

Child

Carbapenemase

Multidrug-resistance

Beta-lactamase epidemiology

ABSTRACT

Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (CPKp) infections are important threats to pediatric populations. Thus, a retrospective study was conducted in a Brazilian reference pediatric hospital, and 26 CPKp isolates obtained from 23 patients were characterized. The affected population had important underlying diseases, reflecting previous hospitalization and antibiotic use. Most CPKp isolates were resistant to all antibiotic classes, and *bla*_{KPC-2} was the only carbapenemase-encoding gene. *bla*_{CTX-M-15} was common among the isolates, and modification or absence of the *mgrB* gene was the cause of polymyxin B resistance. Ten different sequence types were identified, and clonal complex 258 was prevalent. Alleles *wzi50* and *wzi64* were the most recurrent ones regarding K-locus type, with a remarkable contribution of the epidemic ST11/KL64 lineage as a colonizer. Our findings show that lineages associated with the pediatric population are similar to those found in adults, reinforcing the need for epidemiological surveillance to effectively implement prevention and control measures.

© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Children and newborns are vulnerable to infections caused by antimicrobial-resistant bacteria mainly because of the few available antibiotics due to side effects [1]. Regarding beta-lactams, most should be used with prudence due to the increasing prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) [2]. Therefore, carbapenems are generally used as one of the last therapeutic options for the treatment of critically ill patients, but their use can contribute to the selection of resistant pathogens [3]. An increasing number of studies have reported infection by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (CPKp) in pediatric patients [4–6].

The World Health Organization characterized CPKp as critical pathogens that threaten humans [7]. Among the carbapenemases reported worldwide, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) is one of the foremost enzymes [1]. Previous studies have shown a higher prevalence of KPC-producing *K. pneumoniae* in the United States, Canada, Greece, Colombia, and China [8–10]. In Brazil, the incidence of CPKp has exponentially increased over the years, and these organisms are considered to be the cause of serious health care-associated

infections [11]. A study performed in 10 tertiary-care hospitals in São Paulo, Brazil, reported an increased occurrence of carbapenem resistance, with *bla*_{KPC} as the most detected gene among the CPKp [12].

Although few studies have compared the diversity of carbapenemases between the adult and the pediatric population, some have reported that the type of carbapenemase can vary between these 2 populations [8,9,13]. Brazil has a high incidence of *bla*_{KPC-2}-carrying *K. pneumoniae* among adult patients infected or colonized by CPKp [14], but little is known regarding the pediatric population in the country [15–17]. The clonal expansion of CPKp has largely been mediated by the clonal complex 258 (CC258), which mainly includes the sequence types (STs) ST11, ST258, ST340, ST437, and ST512 [18,19]. Lineages of this complex are considered high-risk clones due to the wide presence of antibiotic resistance genes and their ability to spread swiftly, mainly through hospital environments [20].

In addition to antibiotic resistance, the emergence of hypervirulent *K. pneumoniae* has become a global concern among pediatric populations [21,22]. Traditionally, hypervirulent strains often present susceptibility to more antibiotics than the classical (not hypervirulent) strains. However, hypervirulent CPKp strains have been increasingly reported in clinical settings in the past few years, including in children [23–27].

The determinant factors for hypervirulence include capsules, siderophores, lipopolysaccharide, and fimbriae [28]. In part, many of

* Corresponding author. Tel.: +55-17-3201-5918; fax: +55 17 3229 1777.
E-mail address: tiago.casella@famerp.br (T. Casella).