

Letícia Busato Migliorini

**ESTUDO DA COLONIZAÇÃO INTESTINAL COMO FATOR DE RISCO
PARA INFECÇÃO E DISSEMINAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS
RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS NO AMBIENTE HOSPITALAR**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde.

São Paulo

2022

Letícia Busato Migliorini

**ESTUDO DA COLONIZAÇÃO INTESTINAL COMO FATOR DE RISCO
PARA INFECÇÃO E DISSEMINAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS
RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS NO AMBIENTE HOSPITALAR**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Severino

São Paulo

2022

Migliorini, Letícia Busato

Estudo da colonização intestinal como fator de risco para infecção e disseminação de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos no ambiente hospitalar / Letícia Busato Migliorini. -- São Paulo, 2022.
xix, 98 f.

Tese (Doutorado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *A study of intestinal colonization as a risk factor for infection and dissemination of carbapenem-resistant enterobacteria in the hospital environment.*

1. Carga bacteriana. 2. *Klebsiella pneumoniae*. 3. Beta-lactamases.
4. Sequenciamento completo do genoma.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Letícia Busato Migliorini

**ESTUDO DA COLONIZAÇÃO INTESTINAL COMO FATOR DE RISCO
PARA INFECÇÃO E DISSEMINAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS
RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS NO AMBIENTE HOSPITALAR**

Presidente da banca: Profa. Dra. Patricia Severino

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Prof. Dr. Adriano José Pereira

Dr. Moacyr Silva Júnior

Profa. Dra. Quézia Moura da Silva

Membros suplentes:

Dra. Miriam Rodriguez Fernandes

Prof. Dr. Rodrigo Cayô da Silva

Aprovada em: 15/06/2022.

Dedicatória

Dedico esta tese de doutorado aos meus pais, irmão e marido que sempre me incentivaram e apoiaram em todos os momentos.

Agradecimentos

À toda minha família, pelo entendimento e paciência em todos estes anos, em especial aos meus pais Álvaro e Rosane, ao meu irmão Ricardo e ao marido Raul que sempre estiveram ao meu lado e deram suporte nesta longa trajetória.

À minha orientadora, Profa. Dra. Patricia Severino, que aceitou retomar a Microbiologia como linha de pesquisa e por isso tive a oportunidade de desenvolver este trabalho no hospital. Obrigada por toda paciência e ensinamentos.

Aos meus amigos, pelos momentos de descontração e risadas que tornam a vida mais leve, em especial aos amigos que acompanharam de perto ou participaram do desenvolvimento deste trabalho, Romário, Laura e Elisa. Obrigada pelas risadas, conversas de altíssima qualidade e reflexões filosóficas que faziam dos nossos cafés uma nova Acrópole.

Ao Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, por toda infraestrutura cedida, à CAPES pelo auxílio financeiro e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) número do processo: 2018/19243-4 pelos custos relacionados ao projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Só é útil o conhecimento que nos torna melhores”.

(Sócrates)

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xiv
Lista de abreviaturas	xv
Resumo	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
1.2 Resistência a antimicrobianos em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
1.2.1 Resistência intrínseca de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
1.2.2 Resistência adquirida de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
1.2.2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase	8
1.2.2.2 Plasmídeos associados a <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase	9
1.3 Patogenicidade e virulência em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
1.3.1 Fatores de patogenicidade	12
1.3.2 Fatores de virulência	15
1.4 Epidemiologia e estrutura populacional de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
1.5 Classificação de patógenos como endêmicos e esporádicos.....	21
1.6 Fatores relacionados com a progressão para a infecção em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	22
1.7 Objetivos.....	25
2 MÉTODOS	26
2.1 Desenho do estudo	26
2.2 Seleção dos isolados bacterianos e dados microbiológicos de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	26
2.3 Programa de vigilância de bactérias multirresistentes do Hospital Israelita Albert Einstein.....	28
2.4 Detecção molecular do gene <i>bla_{KPC}</i> em isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
2.5 Taxa de prevalência de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
2.6 Identificação de casos de colonização e infecção por <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes aos carbapenêmicos	30
2.7 Seleção dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> para análises experimentais	31

2.8 Avaliação da viabilidade e estoque dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	31
2.9 Extração de DNA dos isolados bacterianos.....	32
2.10 Eletroforese de campo pulsado (<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>)	33
2.11 Classificação dos isolados como endêmicos e esporádicos	35
2.12 Sequenciamento de genoma.....	35
2.13 Montagem dos genomas	37
2.14 Determinação dos tipos de sequências (<i>sequence type</i>)	37
2.15 Determinação dos elementos genéticos de virulência e resistência.....	38
2.16 Determinação da carga intestinal relativa de Enterobactérias Resistentes aos Carbapenêmicos e bactérias carreadoras de <i>bla_{KPC}</i>	38
2.16.1 Seleção de amostras para determinação da carga intestinal relativa de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e bactérias carreadoras de <i>bla_{KPC}</i> ...	39
2.16.2 Método microbiológico para determinação da carga intestinal relativa de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos.....	40
2.16.3 Método molecular para determinação da carga intestinal relativa de bactérias carreadoras de <i>bla_{KPC}</i>	40
2.16.4 Significância estatística	43
2.17 Aspectos éticos	43
3 RESULTADOS	44
3.1 Prevalência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> no Hospital Israelita Albert Einstein ao longo do tempo.....	44
3.2 Prevalência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em diferentes tipos de amostras clínicas ...	47
3.3 Prevalência de pacientes com infecções por <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes aos carbapenêmicos subsequentes à colonização intestinal	49
3.4 Caracterização da população de <i>Klebsiella pneumoniae</i> endêmica e esporádica do Hospital Israelita Albert Einstein por Eletroforese em gel de campo pulsado e a relação com as infecções subsequentes à colonização e com o aumento das taxas de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos.....	50
3.5 Caracterização de <i>Klebsiella pneumoniae</i> circulantes no Hospital Israelita Albert Einstein baseado no tipo de sequência e a relação com infecções subsequentes à colonização.....	54
3.6 Determinantes genéticos de virulência presentes nas <i>Klebsiella pneumoniae</i> circulantes no Hospital Israelita Albert Einstein e a potencial relação com as infecções subsequentes	57

3.7 Avaliação da carga intestinal relativa de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e bactérias carreadoras do gene <i>bla</i> _{KPC} e sua relação com as infecções subsequentes	62
3.8 Perfil de resistência a antibióticos, determinantes genéticos de resistência, variantes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase encontradas no hospital e seus contextos genômicos em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	66
3.8.1 Perfil de resistência a antibióticos e determinantes genéticos para a resistência a cefalosporinas, aminoglicosídeos e fluoroquinolona	66
3.8.2 Variantes de <i>bla</i> _{KPC} e seus contextos genômicos em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	70
4 DISCUSSÃO	74
5 CONCLUSÕES	81
6 REFERÊNCIAS	82
Abstract	
Apêndices	

Lista de figuras

Figura 1. Taxonomia de <i>Klebsiella pneumoniae</i> baseada no genoma completo	3
Figura 2. Distribuição geográfica dos genes de carbapenemase em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
Figura 3. Funções das fímbrias tipo 1 e tipo 3 na infecção e formação de biofilme.....	15
Figura 4. Estrutura dos elementos conjugativos e integrativos.....	17
Figura 5. Distribuição geográfica dos complexos clonais de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes aos carbapenêmicos	20
Figura 6. Distribuição geográfica dos complexos clonais de <i>Klebsiella pneumoniae</i> suscetíveis aos carbapenêmicos e resistentes às cefalosporinas.....	20
Figura 7. Avaliação de risco e gerenciamento de pacientes colonizados com <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase	24
Figura 8. Desenho do estudo: objetivos e população considerada em cada análise....	26
Figura 9. Prevalência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> no Hospital Israelita Albert Einstein..	44
Figura 10. Prevalência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes aos carbapenêmicos no Hospital Israelita Albert Einstein	45
Figura 11. Incidência de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos ao longo do tempo	46
Figura 12. Prevalência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes aos carbapenêmicos e carreadoras de <i>bla_{KPC}</i> nas amostras de colonização intestinal e demais amostras clínicas de pacientes internados no Hospital Israelita Albert Einstein	47
Figura 13. Prevalência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em diferentes espécimes clínicas ..	48
Figura 14. Prevalência de pacientes colonizados por <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes aos carbapenêmicos com infecções subsequentes a colonização.....	49
Figura 15. Isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> selecionados para a análise por eletrofose em gel de campo pulsado.....	51
Figura 16. Distribuição temporal dos 176 isolados endêmicos e esporádicos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> carreadora de <i>bla_{KPC}</i> de acordo com o perfil de bandas.....	52
Figura 17. Caracterização dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em linhagens endêmicas e esporádicas circulantes no período avaliado	53
Figura 18. Frequência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> endêmicas e esporádicas nos períodos de maior incidência de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e prevalência de	

<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes aos carbapenêmicos	54
Figura 19. Frequência do tipo de sequência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> encontradas no hospital	55
Figura 20. Frequência dos tipos de sequência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> encontrados nos isolados esporádicos e endêmicos	56
Figura 21. Distribuição de isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> carreadora de <i>bla</i> _{KPC} endêmicos e esporádicos em dois períodos diferentes.....	56
Figura 22. Frequência dos tipos de sequência em linhagens endêmicas e esporádicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> nas amostras envolvidas ou não com infecções de pacientes colonizados por <i>Klebsiella pneumoniae</i> carreadora de <i>bla</i> _{KPC}	57
Figura 23. Frequência dos tipos de sequência em linhagens endêmicas e esporádicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> nas amostras envolvidas ou não com infecções de pacientes colonizados por <i>Klebsiella pneumoniae</i> carreadora de <i>bla</i> _{KPC} avaliada por períodos	57
Figura 24. Tipos capsulares (K-Tipo) e antígenos-O (O-tipo) dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> carreadora de <i>bla</i> _{KPC}	58
Figura 25. Genes de virulência presentes nos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> carreadora de <i>bla</i> _{KPC}	59
Figura 26. Presença do <i>locus</i> Ybt associado ou não com o gene que codifica colibactin de acordo com o tipo de sequência da cepa e classificadas por períodos	60
Figura 27. Frequência de isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> carreadores e não carreadores de <i>manBC</i> isoladas em amostras de colonização e infecção.....	61
Figura 28. Avaliação da carga intestinal de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e bactérias carreadoras de <i>bla</i> _{KPC} em pacientes internados no hospital	62
Figura 29. Quantificação da carga intestinal relativa de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e bactérias carreadoras de <i>bla</i> _{KPC} por método microbiológico e molecular, respectivamente.....	63
Figura 30. Avaliação das cargas intestinais relativas em pacientes colonizados por <i>Klebsiella pneumoniae</i> carreadora de <i>bla</i> _{KPC} que desenvolveram ou não infecções subsequentes considerando admissão em Unidade de Terapia Intensiva, semi-intensiva ou clínica médica e clínica cirúrgica	65
Figura 31. Avaliação da carga relativa de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos antes e após o desenvolvimento das infecções	65
Figura 32. Perfil de suscetibilidade para as <i>Klebsiella pneumoniae</i> carreadoras de <i>bla</i> _{KPC}	

isoladas em amostras de infecção 67

Figura 33. Genes relacionados com a resistência de *Klebsiella pneumoniae* aos Aminoglicosídeos, Cefalosporinas, Fluoroquinolonas e Carbapenêmicos encontrados nos isolados relacionados com a infecção 68

Figura 34. Isolados carregando o gene *bla*_{KPC} em plasmídeos semelhantes a pKpQIL . 72

Lista de tabelas

Tabela 1. Genes utilizados para tipagem de sequência <i>multilocus</i>	38
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados para a qPCR	42
Tabela 3. Períodos (em meses) de maior incidência de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos	46
Tabela 4. Fatores de risco para infecção avaliados neste estudo.....	64
Tabela 5. Alterações de aminoácidos encontradas nos 54 isolados de infecção devido a mutações cromossômicas nos genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i> que estão relacionados à resistência as fluoroquinolonas (ciprofloxacina)	69
Tabela 6. <i>Klebsiella pneumoniae</i> carreadoras das variantes <i>bla</i> _{KPC-3} e <i>bla</i> _{KPC-33} e <i>bla</i> _{KPC-30} isoladas no Hospital Israelita Albert Einstein	71

Lista de abreviaturas

ampC	Ampicilinase C
Asp	Aspartato
backKPC	Bactérias carreadoras de <i>bla</i> _{KPC}
BAT	Bactérias aeróbias totais
CC	Complexo clonal
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
cgMLST	Tipagem multilocus do genoma central (<i>Core genome multilocus sequence typing</i>)
Clb	Colibactin
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
COX	Cicloxigenase (<i>Cyclooxygenase</i>)
CPS	Cápsula polissacarídica
Ct	Ciclo limite (<i>Cycle threshold</i>)
CTX-M	Cefotaximase
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ent	Enterobactin
ERC	Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos
ESBLs	Beta-lactamase de espectro estendido (<i>Extended spectrum beta-lactamase</i>)
Glu	Glutamato
GRS	Escore de risco de Gianella (<i>Gianella Risk Score</i>)
GT	Glicosiltransferases
HIAE	Hospital Israelita Albert Einstein
Hv	Hipervirulenta
ICE	Elementos conjugativos e integrativos (<i>Integrative conjugative elements</i>)
<i>ICEKp</i>	Elementos Conjugativos e Integrativos em <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Inc	Grupos de incompatibilidade de plasmídeos (<i>Incompatibility groups plasmids</i>)
iro	Salmochelín

IS	Sequência de inserção (<i>Insertion sequence</i>)
iuc	Aerobactin
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
KpKPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carreadora de <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
KpOXA	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carreadora de oxacilinase-48
KpRC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes aos carbapenêmicos
KpRCef	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente às cefalosporinas
LB	Luria Bertani
Lcn2	Lipocalin 2
LPS	Lipopolissacarídeo
MBLs	Metallo beta-lactamases (<i>Metallo-beta lactamases</i>)
MCR-1	Resistência mobilizável à colistina (<i>Mobilized colistin resistance</i>)
MDR	Multirresistente (<i>Multidrug-resistant</i>)
MIC	Concentração inibitória mínima (<i>Minimum inhibitory concentration</i>)
MLST	Tipagem de sequência multilocus (<i>Multilocus sequence typing</i>)
Mpb	Mega pares de base (<i>Mega base pairs</i>)
NCBI	Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NDM	New Dehli Metalobetalactamase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORFs	Região de leitura aberta (<i>Open read frames</i>)
OXA	Oxacilinase
PAV	Pneumonia associada à ventilação mecânica
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PFGE	Eletróforese em gel de campo pulsado (<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>)
PNAG	N-acetilglucosamina ligada à poli-b
qPCR	PCR quantitativo
Rpm	Rotação por minuto
rRNA	RNA ribossômico
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (<i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i>)
SCIH	Serviço de Controle de Infecção Hospitalar

Semi-UTI	Unidade de terapia semi-intensiva
Ser	Serina
SHV	Variável reagente de sulfidril (Sulfhydryl reagent variable)
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (Single-nucleotide polymorphism)
ST	Tipo de sequência (Sequence type)
T4SS	Sistema de secreção tipo 4 (Type 4 secretion system)
TE	Tris-EDTA
TEM	Nomeado após o paciente (Temoneira) que forneceu a primeira amostra
TDI	Taxa de incidência
TDP	Taxa de prevalência
UFC	Unidades formadoras de colônias
UTI	Unidade de terapia intensiva
VIM	Verona imipenemase
VFDB	Banco de dados de fator de virulência (Virulence Factor Database)
WGS	Sequenciamento do genoma completo (Whole genome sequence)
Ybt	Yersiniabactin

Resumo

Introdução: As infecções por *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos são de difícil tratamento, e a disseminação de linhagens multirresistentes e hipervirulentas impactam as taxas de mortalidade. A colonização intestinal por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos contribui para a disseminação dessas bactérias no ambiente e para o desenvolvimento de infecções. No entanto, mecanismos envolvidos na progressão da colonização para as infecções não estão bem esclarecidos.

Objetivos: Avaliar a associação entre a virulência e a resistência com endemicidade de *Klebsiella pneumoniae* carreadoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (*bla*_{KPC}) e, em conjunto com a densidade da colonização intestinal por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, avaliar a associação destes fatores com o risco para o desenvolvimento de infecções subsequentes à colonização. **Métodos:** Foram avaliados isolados de *Klebsiella pneumoniae* carreadoras de *bla*_{KPC} e resistentes aos carbapenêmicos provenientes de pacientes internados em um hospital terciário de São Paulo entre 2011 e 2021. A identificação da população endêmica foi realizada por *pulsed field gel electrophoresis* e *multilocus sequence typing*, e a avaliação dos mecanismos de virulência, resistência, tipo capsular e plasmídeos foi realizada por meio da análise de genomas. A densidade de colonização por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e por bactérias carreadoras de *bla*_{KPC} foi avaliada por meio de métodos de quantificação microbiológica e molecular, respectivamente. **Resultados:** Os isolados de infecção apresentaram altas taxas de resistência também às cefalosporinas, fluoroquinolona e aminoglicosídeos, e carregavam determinantes genéticos relacionados com a resistência a estas classes de antibióticos. Os isolados endêmicos estavam geralmente envolvidos nas infecções subsequentes à colonização quando comparados aos isolados esporádicos. Embora tenham sido encontrados importantes mecanismos de virulência, como Elementos Conjugativos e Integrativos em *Klebsiella pneumoniae* e *manBC*, eles sozinhos não explicam a progressão da colonização para a infecção. Em contrapartida, o aumento da carga intestinal relativa de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e/ou de bactérias produtoras de *bla*_{KPC} foi significativamente associado com o desenvolvimento de infecções subsequentes no conjunto de pacientes avaliados. **Conclusões:** Neste trabalho, identificamos que a população endêmica de *Klebsiella pneumoniae* carreadora de *bla*_{KPC}, conforme determinado por perfis de *pulsed field gel*

electrophoresis e *multilocus sequence typing*, eram multirresistentes e foram geralmente encontrados nos episódios de infecções subsequentes à colonização intestinal quando comparadas com isolados esporádicos. Observou-se ainda que a densidade da colonização intestinal apresentou um papel importante no desenvolvimento das infecções. Diante da dificuldade em tratar as infecções por bactérias multirresistentes, conhecer a população bacteriana circulante em um ambiente, identificar e interromper as vias de transmissão e atuar sobre a colonização intestinal no sentido de diminuir a densidade de colonização por *Klebsiella pneumoniae* carreadoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase podem ser importantes abordagens para evitar o desenvolvimento de infecções de difícil tratamento.

Descritores: Carga Bacteriana; *Klebsiella pneumoniae*; Beta-Lactamases; Sequenciamento completo do genoma

1 INTRODUÇÃO

O aumento da resistência bacteriana global e a falta de antibióticos para tratar infecções provocadas por bactérias multirresistentes (MDR – *multidrug-resistant*) tem mobilizado a comunidade científica na busca de novas abordagens para prevenir e tratar essas infecções.⁽¹⁻⁴⁾ Com o avanço nas técnicas de sequenciamento de genoma, a vigilância epidemiológica molecular tem se tornado uma ferramenta cada vez mais poderosa para identificar as potenciais fontes de disseminação e interromper as vias de transmissão desses patógenos.^(5,6) Além disso, a vigilância epidemiológica molecular permite a identificação e caracterização dos clones de alto risco para infecção, colonização e transmissão nosocomial, os quais estão dispersos ao redor do mundo.^(5,7,8)

Atualmente, as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC) são um grande problema de saúde pública devido às altas taxas de resistência associadas e estão listadas pela Organização Mundial da Saúde como patógenos prioritários para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.⁽⁹⁾ *Klebsiella pneumoniae* é uma enterobactéria amplamente disseminada pelo mundo, e conhecida como fonte primária e de disseminação de diversos mecanismos de resistência, dentre eles *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), New Delhi metalobetalactamase (NDM), as beta-lactamases de espectro estendido (ESBL – *extended spectrum beta-lactamase*), dentre elas a Cefotaximase (CTX-M) e genes de resistência à colistina, como resistência mobilizável à colistina (MCR-1 – *mobilized colistin resistance*).^(8,10-15)

No Brasil, *Klebsiella pneumoniae* carreadoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KpKPC) são epidêmicas e estão associadas a diversos surtos de infecções hospitalares, acometendo principalmente indivíduos imunodeprimidos e neonatos.⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ A disseminação de linhagens MDR e hipervirulentas (Hv) de *Klebsiella pneumoniae* impactam as taxas de mortalidade, chegando a 95% para cepas de Hv e 42% versus 21% para cepas MDR e suscetíveis, respectivamente.⁽¹⁹⁻²¹⁾ Essas linhagens podem ser associadas a tipos de sequência específicos (ST – *sequence type*), como ST16 (linhagens Hv) e ST11, ST437, ST258, ST512 (linhagens MDR).⁽¹⁹⁻²¹⁾ Diante das restritas opções de antibióticos para tratar infecções por KpKPC, identificar os riscos e prevenir infecções é considerada uma importante abordagem terapêutica.

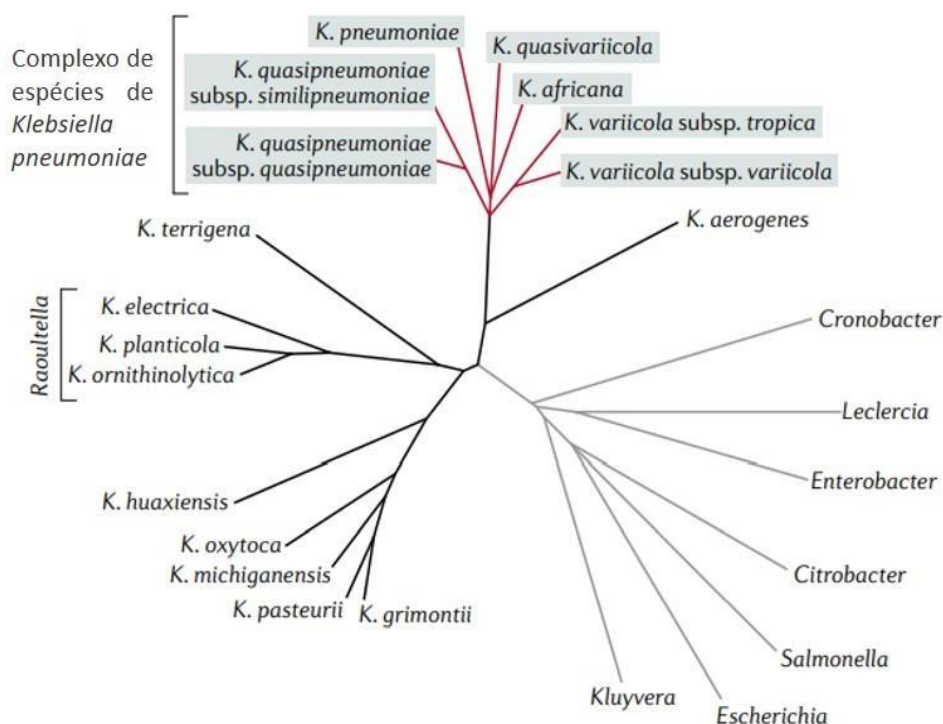
A colonização intestinal tem emergido como uma importante fonte para o desenvolvimento das infecções.^(22,23) Os mecanismos envolvidos na progressão

da colonização para a infecção não estão bem esclarecidos. Embora sejam bem elucidados os mecanismos de virulência que contribuem para o estabelecimento das infecções, como os sideróforos Yersiniabactin (Ybt) codificados pelos genes *ybt*, eles por si só não explicam a progressão da colonização para a infecção como reportado recentemente.⁽²⁴⁾ Em contrapartida, a densidade da colonização intestinal por *Klebsiella pneumoniae* tem emergido como um fator de risco associado à progressão da colonização para infecção.⁽²⁵⁻²⁷⁾

Neste estudo, nós avaliamos KpKPC isoladas em um único hospital terciário dentro de um período de 10 anos. As cepas foram avaliadas quanto ao ST, determinantes genéticos de resistência e virulência, presença de plasmídeos e a associação com a progressão da colonização para a infecção.

1.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria gram negativa pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, a qual pertencem também gêneros bem conhecidos como *Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*.⁽²⁸⁾ Atualmente, com a taxonomia baseada em genoma, as cepas de *Klebsiella* que compartilham 95 a 96% da identidade de nucleotídeos são diferenciadas entre si e agrupadas dentro do Complexo de Espécies de *Klebsiella pneumoniae* que compreendem: *Klebsiella pneumoniae stricto sensu* (Kp1), *Klebsiella quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae* (Kp2), *Klebsiella quasipneumoniae subsp. similipneumoniae* (Kp4), *Klebsiella variicola subsp. variicola* (Kp3), *Klebsiella variicola subsp. tropica* (Kp5), *Klebsiella quasivariicola* (Kp6), *Klebsiella africana* (Kp7) (Figura 1).⁽²⁹⁻³¹⁾ Devido à alta prevalência nas amostras biológicas (85%) e à sua importância clínica, a maioria dos estudos são voltados para *Klebsiella pneumoniae stricto sensu*.^(29,32-35)



Árvore filogenética baseada no genoma de *Klebsiella pneumoniae*. Os integrantes do complexo de espécies de *Klebsiella pneumoniae* que compartilham 95-96% de similaridade no genoma estão destacados nos ramos em vermelho, outros membros do gênero *Klebsiella* e *Enterobacteriaceae* estão demonstrados nos ramos em preto e cinza, respectivamente.

Fonte: Traduzido de Wyres KL, Lam MM, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat Rev Microbiol. 2020;18(6):344–59. Figure 1. Taxonomic position of *Klebsiella pneumoniae*; p. 346.⁽⁵⁾

Figura 1. Taxonomia de *Klebsiella pneumoniae* baseada no genoma completo

Klebsiella pneumoniae apresenta uma grande plasticidade genética, e isso torna possível sua adaptação em diferentes nichos ecológicos. O genoma total contém 5 a 6 milhões de pares de base (pb) que codificam 5.000 a 6.000 genes, dos quais aproximadamente 1.700 são conservados no genoma central e estão presentes em todos os membros da espécie.^(29,33) O restante está presente no genoma acessório o qual é altamente variável entre as espécies e podem ser compartilhados entre si ou entre outras enterobactérias, dependendo da pressão seletiva.^(29,33) *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria ubíqua encontrada em águas, solos, plantas, insetos, pássaros e mamíferos.⁽³⁶⁻³⁸⁾ Pode ser de vida livre ou associada a um hospedeiro como um organismo comensal ou patógeno em potencial.⁽³⁸⁾ Especificamente na interação com o humano, *Klebsiella pneumoniae* pode ser: comensal quando presente na colonização intestinal ou do trato respiratório; patógeno, quando infectam indivíduos saudáveis; e patógeno oportunista, quando infectam indivíduos imunodeprimidos.^(22,39-42)

A colonização comensal por *Klebsiella pneumoniae* pode ocorrer na comunidade e varia de acordo com a idade do indivíduo, localização geográfica e contato com sistemas de saúde.^(22,43,44) A prevalência da colonização por *Klebsiella pneumoniae* pode ser até seis vezes maior em indivíduos expostos a centros de saúde e a duração da colonização pode variar, chegando a um ano. Também, *Klebsiella pneumoniae* pode causar infecções em indivíduos saudáveis, sendo as infecções comunitárias mais comuns: fascíte necrosante, abscesso não hepático, endoftalmite, meningite e abscesso hepático piogênico.^(41,42,45,46) As infecções comunitárias por *Klebsiella pneumoniae* são geralmente associadas a cepas Hv e suscetíveis aos antimicrobianos.⁽⁸⁾

As infecções por *Klebsiella pneumoniae* geralmente são oportunistas e estão associadas aos cuidados em saúde, acometendo principalmente grupos mais vulneráveis como neonatos, idosos, indivíduos imunodeprimidos e com dispositivos médicos invasivos e transplantados.^(6,17,18,47-51) As infecções mais comuns são do trato urinário e pneumonias que podem progredir para sepse ou choque séptico.^(26,52,53) As taxas de mortalidade associadas a infecções por *Klebsiella pneumoniae* podem variar de acordo com o fenótipo de resistência do isolado, chegando a 42% em infecções provocadas por *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos (KpRC) versus 21% em isolados suscetíveis.⁽²¹⁾

Klebsiella pneumoniae foi isolada pela primeira vez em 1882 por Carl Friedländer como agente causador de pneumonia, e atualmente, é um dos principais patógenos nosocomiais mundialmente dispersos que ameaçam os sistemas de saúde público devido às altas taxas de resistência bacteriana.^(1,9,54) Nas últimas duas décadas, a maioria dos novos genes de resistência foram detectados pela primeira vez em *Klebsiella pneumoniae* antes de se disseminarem para outras bactérias, incluindo as ESBL, variável reagente de sulfidril (SHV – *sulfhydryl reagent variable*), CTX-M, KPC, NDM e o gene que confere resistência à Colistina (MCR-1).⁽¹⁰⁻¹⁵⁾ Isto demonstra o importante papel de *Klebsiella pneumoniae* como fonte de aquisição e disseminação de importantes mecanismos de resistência, e sob a qual deve-se manter a vigilância constante.⁽⁵⁵⁾

Na Europa, anualmente, cerca de 90.000 infecções e 7.000 mortes são causadas por enterobactérias resistentes aos antimicrobianos.⁽⁴⁹⁾ Nos Estados Unidos, somente em 2019, aproximadamente 13.100 pacientes foram hospitalizados e 1.100 morreram devido a infecções por ERC, gerando um custo de 130 milhões de dólares ao sistema de saúde de acordo com o centro de controle e prevenção de doenças

(CDC – Centers for Disease Control and Prevention).⁽⁹⁾

As infecções provocadas por bactérias resistentes aos antimicrobianos são de difícil tratamento e estão associadas com maiores taxas de mortalidade e custos ao sistema de saúde. A menos que medidas sejam tomadas, as infecções associadas a bactérias resistentes podem causar 10 milhões de mortes a cada ano e um impacto econômico global projetado de 100 trilhões de dólares até 2050.^(56,57)

1.2 Resistência a antimicrobianos em *Klebsiella pneumoniae*

As ERC são um problema de saúde pública global e estão listadas segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) como patógenos prioritários para Pesquisa e Desenvolvimento de novos fármacos, juntamente com *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos.⁽⁵⁸⁾ Dentre as enterobactérias, a *Klebsiella pneumoniae*, especificamente, apresenta um papel importante no aumento das taxas de ERC ao redor do mundo.

Os carbapenêmicos são antimicrobianos beta-lactâmicos de amplo espectro considerados de última escolha para o tratamento de infecções por bactérias MDR, ou seja, bactérias resistentes a outras classes de antimicrobianos, como Fluoroquinolonas, Aminoglicosídeos ou outros beta-lactâmicos, dentre eles cefalosporinas.^(59,60) Com o aumento da resistência aos carbapenêmicos, antigos antimicrobianos como a Polimixina B e trimetoprim-sulfametoxazol foram reintroduzidos na prática clínica evidenciando a falta de opções para o tratamento de infecções por bactérias MDR.⁽⁶¹⁻⁶³⁾ No entanto, as ERC frequentemente apresentam também mecanismos cruzados de resistência aos antimicrobianos, o que limita bastante as opções de tratamento.⁽⁵⁹⁾

Em *Klebsiella pneumoniae*, a resistência é complexa e pode estar associada a mecanismos intrínsecos e adquiridos por transferência horizontal de genes.⁽⁵⁾ A resistência intrínseca ocorre pela presença ou alterações em genes presentes no genoma central, como *bla_{SHV}*, *fosA*, *oqxAB*, *ompK35*, *ompK36* e *mgrB*, responsáveis pela produção de beta-lactamases, bombas de efluxo, alterações na permeabilidade da membrana, ou modificações em estruturas alvo, como o Lipopolissacarídeo (LPS), respectivamente. No entanto, a resistência adquirida ocorre principalmente por enzimas que degradam os antimicrobianos, dentre elas as ESBL e carbapenemases.^(5,7,29,55,64-66)

1.2.1 Resistência intrínseca de *Klebsiella pneumoniae*

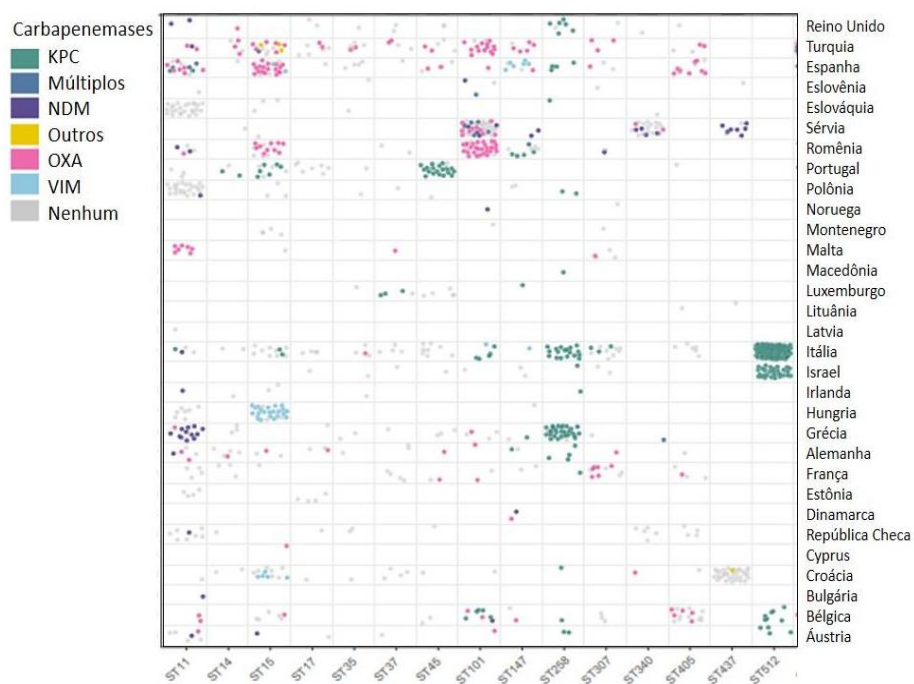
Klebsiella pneumoniae é intrinsecamente resistente à ampicilina devido à presença do gene *bla_{SHV}* que codifica a beta-lactamase SHV.⁽²⁹⁾ Este gene pode ser mobilizado do cromossomo por sequências de inserção (IS26) formando elementos genéticos móveis que podem ser transferidos para outras espécies.^(67,68) Essas variantes móveis podem assumir atividade de ESBL ou carbapenemases devido a mutações pontuais tornando a *Klebsiella pneumoniae* resistente a cefalosporinas (KpCef) e aos carbapenêmicos, além da ampicilina.⁽⁶⁸⁾ Os genes *oqxAB* e *fosA* também estão presentes no genoma central e podem ser mobilizáveis.^(64,65) Estes genes codificam bombas de efluxo e Transferase S-glutationa que conferem resistência a quinolonas e fosfomicina, respectivamente. Também, *oqxAB* juntamente com *acrAB* codificam bombas de efluxo associadas a resistência cruzada à múltiplos antibióticos, dentre eles fluoroquinolonas, nitrofurantoína, tigeciclina e cloranfenicol.^(64,65,69-71) *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* são genes cromossomais relacionados com a DNA girase e a topoisomerase IV, e alterações nestes genes podem alterar o sítio alvo do antibiótico e levar à resistência às fluoroquinolonas.⁽⁷²⁾ Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* susceptíveis à Ciprofloxacina apresentam os aminoácidos Serina (Ser) na posição 83 e Aspartato (Asp) na posição 87 no gene *gyrA*; Ser na posição 80 e Glutamato (Glu) na posição 84 no gene *parC*. Alterações de aminoácidos nestas posições reduzem a afinidade das fluoroquinolonas aos respectivos sítios alvos de atuação, DNA girase (*gyrA*) e topoisomerase IV (*parC*).⁽⁷²⁾ A resistência à polimixina B está relacionada a mutações pontuais ou inativação do gene *mgrB* que levam à alteração no lipídeo A do LPS impedindo a ligação da polimixina B ao sítio alvo.⁽⁷³⁾

Os genes *ompK35* e *ompK36* codificam para porinas e a presença de mutações pode levar a alterações na conformação das porinas impedindo a entrada dos carbapenêmicos na célula.^(66,74,75) No entanto, em *Klebsiella pneumoniae* a resistência aos carbapenêmicos está mais relacionada com genes de resistência adquiridos do que mecanismos intrínsecos.^(7,55)

1.2.2 Resistência adquirida de *Klebsiella pneumoniae*

A maior parte da resistência observada em *Klebsiella pneumoniae* está associada a genes acessórios adquiridos por transferência horizontal.⁽⁵⁵⁾ Esses genes são carregados em elementos móveis, como plasmídeos, transposons e sequências de inserção, e podem ser facilmente transferidos inter e intraespécies.^(7,55,76)

As beta-lactamases são os principais mecanismos de resistência encontrados em *Klebsiella pneumoniae*, e a prevalência de determinados tipos ESBL e carbapenemases varia conforme a região geográfica.^(5,77) No Brasil, Itália, Israel, Grécia e Bélgica, a KPC é a principal carbapenemase encontrada em *Klebsiella pneumoniae* (Figura 2). Enquanto que na Espanha, Turquia, Romênia, Alemanha e França, a oxacilinase (OXA) é frequentemente encontrada. Já na Hungria, a Verona imipenemase (VIM) é a principal carbapenemase observada em *Klebsiella pneumoniae*⁽⁸⁾ (Figura 2).



KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. NDM: *New Dehli Metalobetalactamase*. OXA: oxacilinase. VIM: verona imipenemase. Cada círculo representa um genoma, colorido pela respectiva carbapenemase. Fonte: Traduzido e adaptado de Lam MM, 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):1-16. Figure 2. Kleborate genotyping results for European *Klebsiella pneumoniae* surveillance isolates; p. 5.⁽⁸⁾

Figura 2. Distribuição geográfica dos genes de carbapenemase em *Klebsiella pneumoniae*

As beta-lactamases são classificadas de acordo com as suas propriedades funcionais (Classificação de Bush – Grupos 1, 2, 3, 4) e molecular (Classificação de Ambler – Grupos A, B, C, D).^(78,79) Segundo a classificação funcional de Bush et al., elas estão divididas em 4 grupos de acordo com o substrato que degradam e seu perfil de inibição: o Grupo 1 (Classe C) compreende as cefalosporinases; Grupo 2 (Classes A) é formado por ESBL: CTX-M, IMP, VIM e Temoneira (TEM), e as serinocarbapenemases (KPC); Grupo 3 (Classe B) compreende as metallo-beta-lactamases (NDM); e o Grupo 4 (Classe D) compreende as OXA.^(79,80) Quanto à classificação molecular, as carbapenemases são classificadas em dois grupos: Serinocarbapenemases e metalo-beta-lactamases (MBL – *metallo-beta lactamases*). Ambas degradam os carbapenêmicos, a diferença consiste na presença de um resíduo de serina no sítio ativo da enzima KPC e a necessidade de metais como cofatores enzimáticos nas MBL.⁽⁷⁷⁾

1.2.2.1 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

A KPC é uma serinocarbapenemase da Classe A com 66 variantes reportadas que degrada todos os β -lactâmicos, como carbapenêmicos, cefalosporinas (incluindo oxyimino-cephalosporina), penicilinas e Aztreonam e pode ser inibida por Clavulanato e Tazobactam.^(77,81) Além das mutações pontuais, algumas variantes de KPC diferem quanto à eficiência catalítica. Por exemplo, a KPC-2 e KPC-3 que são variantes bem descritas e amplamente disseminadas no mundo e diferem entre si pela substituição da Histidina pela Tirosina na posição 272 da cadeia de aminoácidos. Esta substituição de aminoácidos no sítio catalítico da enzima contribui para o aumento da eficiência catalítica da KPC-3 em relação a KPC-2 frente à ceftazidima, contribuindo para o aumento da concentração inibitória mínima (MIC – *minimum inhibitory concentration*) para este antimicrobiano.⁽⁸²⁻⁸⁶⁾ E mais recentemente, também foi descrita com atividade contra ceftazidima-avibactam (CZA), semelhante à KPC-33.⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾

Desde a sua descoberta na Carolina do Norte (USA) em 1996, a KPC disseminou-se rapidamente ao redor do mundo.^(15,90-94) A KPC é comumente encontrada em *Enterobacteriaceae*, especialmente em *Klebsiella pneumoniae*, porém já há relatos do gene *bla*_{KPC} em outras bactérias Gram negativas.⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾

O primeiro relato de *bla*_{KPC} no Brasil foi em 2006, dez anos depois do

primeiro relato de *bla*_{KPC} no mundo (1996).⁽⁹⁸⁾ O fato ocorreu em um hospital de Recife, no nordeste do Brasil, onde quatro pacientes foram infectados por *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC-2.⁽⁹⁸⁾ Logo em seguida a enzima KPC foi reportada em todo o país, mostrando seu grande potencial de disseminação.^(6,15,16,77,98-101)

Atualmente, KpKPC é epidêmica no Brasil e considerada um sério problema de saúde pública.^(16,17) Infecções provocadas por KpKPC são observadas em todas as regiões do país e acometem principalmente indivíduos imunodeprimidos, sendo associadas a maiores períodos de internação, custos hospitalares, surtos de infecção e altas taxas de mortalidade (51,3%).^(6,17,18,48-51) Dentre os pacientes transplantados, as taxas de mortalidade por KpKPC podem chegar a 21,3%.⁽⁵¹⁾

1.2.2.2 Plasmídeos associados a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

O gene *bla*_{KPC} pode ser carregado em diferentes tipos de plasmídeos: IncF, IncN, IncX3, IncR, IncHI1 e IncI2.^(51,55,102-106) Plasmídeos IncFII são amplamente encontrados carregando *bla*_{KPC} em *Klebsiella pneumoniae*, sugerindo uma disseminação bem-sucedida desses plasmídeos.⁽⁵⁵⁾ pKpQIL, um plasmídeo IncFII, foi caracterizado nos Estados Unidos em 2004 carregando *bla*_{KPC-2} e *bla*_{KPC-3}.⁽¹⁰⁷⁾ Em 2006, um plasmídeo altamente similar a pKpQIL foi caracterizado em Israel, e posteriormente plasmídeos altamente similares a pKpQIL carregando *bla*_{KPC} foram encontrados em diferentes países, incluindo no Brasil.^(55,104,108-112) O pKpQIL é bem caracterizado e amplamente reportado na literatura, principalmente por estar relacionado a isolados resistentes e causadores de surtos em diferentes partes do mundo como Israel, Estados Unidos, Grécia, Itália, Polônia e Reino Unido.^(107,112-117)

O pKpQIL é um plasmídeo circular, auto-transmissível com 113.637bp, 136 quadros de leitura aberta (ORF – *open reading frames*) e 67 produtos das ORFs com alta similaridade a proteínas de funções conhecidas, dentre elas TEM-1 e KPC, cujo gene *bla*_{KPC} é carregado no transposon *Tn4401*.^(104,114) Este plasmídeo possui respectivamente 75 e 12% de similaridade com pKPN4 e pNYC, sugerindo que pKpQIL é resultado de um rearranjo entre esses dois plasmídeos. A região comum entre pKpQIL e pKPN4 corresponde a 86.610bp (posição 26360 a 112970 no pKpQIL) e compreende genes responsáveis pela manutenção do plasmídeo, transmissão e resistência antibiótica.⁽¹⁰⁴⁾

Os genes do pKpQIL responsáveis pela manutenção e estabilidade são: 1) *parA* e *parB*, responsáveis pela segregação do plasmídeo; 2) *stbA* e *stbB*, mediadores da estabilidade do plasmídeo; 3) sistemas de modificação de restrição tipo I.^(104,118) A região envolvida na transferência do plasmídeo via conjugação (genes *tra*) corresponde a 30% do plasmídeo (35kb).⁽¹⁰⁴⁾ Além disso, pKpQIL e pKPN4 possuem o transposon *Tn1331* no qual estão posicionados os genes de resistência *aadA*, OXA-9 e TEM-1, semelhante ao reportado previamente para *Tn1331*.^(104,119) Contudo, o pKpQIL apresenta o gene *aadA* truncado devido a presença de *IS26* na posição 682 e o gene OXA-9 inativo devido à presença de mutação *nonsense* (A350G).⁽¹⁰⁴⁾

A região de similaridade entre o pKpQIL e pNYC corresponde a 14,070bp (posição 4829 to 18898) e compreende o transposon *Tn4401* que carrega *bla_{KPC-3}* (10kb).^(104,120) No entanto, o *Tn4401* do pKpQIL contém uma deleção de 100pb na região *upstream* do gene *bla_{KPC}*, correspondendo à isoforma A do *Tn4401* (*Tn4401a*).^(102,104) Esta alteração na região promotora de *bla_{KPC}* pode levar ao aumento da expressão do gene, e consequentemente, ao aumento da MIC para os carbapenêmicos.^(102,121)

O restante do pKpQIL corresponde a uma região *upstream* do *Tn4401* de 4.828 pb que codificam quatro proteínas hipotéticas, uma endonuclease e duas origens de replicação RepA e RepA2 as quais apresentam 96 e 97% de homologia com as RepA do pKP91. E a outra região remanescente corresponde a uma região *downstream* do *Tn4401* de 8,126 pb que codifica para duas transposases, uma proteína hipotética, uma resolvase hipotética e *IS26*.⁽¹⁰⁴⁾

O pKpQIL pertence ao grupo de incompatibilidade IncFII devido à sequência de RepA a qual apresenta 89% de similaridade com IncFII RepA pSLT de *Salmonella enterica*.^(104,122) Em plasmídeos do grupo IncFII foram identificados genes de resistência à quinolona, CTX-M, SHV e Ampicilinase C (*ampC*).⁽¹¹⁸⁾ O gene *bla_{KPC}* foi encontrado no pKpQIL, o primeiro plasmídeo IncFII a carrear *bla_{KPC}*.⁽¹⁰⁴⁾

Embora o plasmídeo pKpQIL tenha sido primeiramente reportado em Israel em 2006, um estudo retrospectivo feito nos Estados Unidos revelou a presença de pKpQIL em *Klebsiella pneumoniae* isolada de um paciente em Nova York em 2004.^(107,114) A similaridade entre as sequências de pKpQIL é alta (99,9%) diferindo em 4 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP – *single-nucleotide polymorphism*) em uma região intergênica, demonstrando que possivelmente a cepa de Israel tenha se originado nos EUA e se disseminado por viagens internacionais.⁽¹⁰⁷⁾ Em seguida, pKpQIL foi

reportado em outras partes do mundo com um importante papel na disseminação de *bla_{KPC}*.^(107,113-117)

No Brasil, além dos plasmídeos IncF, *bla_{KPC}* também foi reportado nos plasmídeos IncM e IncN, dentre eles pKPC. O pKPC-FCF/3SP possui estrutura conservada de IncN e duas regiões adquiridas: *Tn4401b* e IS903B.⁽¹²³⁾ As regiões conservadas de IncN compreendem genes de recombinação (*resP*), replicação (*repA*, *ardB*, *ardR*), regulação da replicação (*ardK*, *ccgEIII*, *ccgD*, *ccgC*, *ccgAI*), reparo de DNA (*mpr*, *umuC*, *mucA*), estabilidade (*stbA*, *stbB*, *stbC*, *fipA*, *eex*, *korA*, *korB*, *kikA*, *EcorII*met, *EcoRII*) e conjugação (genes *tra*). Entre os genes *tra*, está inserido o *Tn4401b*, no qual estão posicionados os genes de *bla_{KPC}*, transposase (*tnpA*), resolvase (*tnpR*), ISKpn7, ISKpn6.^(123,124) Este plasmídeo foi encontrado em um isolado de *Klebsiella pneumoniae* proveniente de um paciente internado em São Paulo em 2009.⁽¹²³⁾ Posteriormente, plasmídeos semelhantes a pKPC-FCF/3SP foram encontrados em isolados de *Escherichia coli* em 2011 e recentemente foi reportado em isolados de *Klebsiella pneumoniae*.^(108,124)

Conhecer o contexto genético no qual está inserido o *bla_{KPC}* auxilia na compreensão da disseminação do gene. Plasmídeos capazes de gerar múltiplas cópias (multireplicon), como os do tipo IncF, são altamente transferíveis para outras bactérias, enquanto que genes de resistência carregados em plasmídeos não multireplicons são difíceis de serem transferidos.^(125,126) Assim, a endemicidade de um gene de resistência pode estar diretamente relacionada com seu contexto genético.

1.3 Patogenicidade e virulência em *Klebsiella pneumoniae*

A capacidade de causar doenças em humanos é atribuída a uma variedade de fatores genéticos presentes em *Klebsiella pneumoniae*, dentre eles os fatores de patogenicidade e virulência.⁽¹²⁷⁾ Os fatores de patogenicidade são requeridos para o estabelecimento da infecção e são codificados por genes presentes no genoma central, enquanto que os fatores de virulência são codificados por genes presentes no genoma acessório e são conhecidos por aumentar ainda mais a gravidade das infecções provocadas por *Klebsiella pneumoniae* e a sua capacidade em causar doenças.⁽⁵⁾

1.3.1 Fatores de patogenicidade

Dentre os fatores de patogenicidade, estão os *loci fim* e *mrk* que codificam para fímbrias tipo 1 e 3, respectivamente; *ent* que codifica o sideróforo enterobactin (*ent*) requerido para o crescimento bacteriano em diversos nichos; *pgaABC* que codificam para adesinas requeridas na formação de biofilme e infecção extra intestinal; *loci* que codificam para a cápsula polissacarídica (CPS) conhecido como antígeno K ou K-tipo e os que codificam para o antígeno O do LPS também conhecido como O-tipo.⁽¹²⁷⁻¹³¹⁾ No entanto, além dos *loci* que codificam os antígenos K e O, os genes reguladores destes são igualmente importantes para determinar a patogenicidade bacteriana, dentre eles, os reguladores associados ao sistema de dois componentes (*pmrAB* e *phoPQ*) para o antígeno O e os reguladores *rmpA*, *rmpA2*, *manB*, *manC*, *mgaA*, *kvgA*, *kvgS*, *rcsA*, *rcsB* e *treC* para a CPS, além dos genes que formam a maquinaria necessária para a biossíntese do açúcar capsular (*manB*, *manC*, genes *wca*, *gnd*, *galF*, e *uge*).⁽¹³²⁻¹³⁷⁾

A CPS é uma matriz polissacarídica que reveste a célula bacteriana e se caracteriza como um importante fator de patogenicidade em *Klebsiella pneumoniae*.^(47,138) A CPS é codificada por um conjunto de genes (*cps*) localizado no cromossomo, dentre eles *wzi*, *wza*, *wzb*, *wzc*, *wzy*, *gnd*, *wca*, *cps*, *cps* e *galF*.⁽¹³⁹⁾ Os polissacarídeos capsulares específicos denominados antígenos K (K1 a K79) atualmente são atribuídos baseados no sequenciamento do *locus wzi* o qual é conservado na espécie e codifica uma proteína de superfície responsável pela fixação da cápsula à membrana externa.⁽¹³⁹⁻¹⁴²⁾

Os genes responsáveis pelo processamento e translocação da CPS na superfície bacteriana são conservados entre os diferentes tipos capsulares (*galF*, *cpsACP*, *wzi*, *wza*, *wzb* e *wzc*), no entanto, os genes localizados no meio do operon que codificam proteínas responsáveis pela polimerização de subunidades específicas e montagem da CPS na superfície bacteriana não são conservados, o que é importante para a variação dos tipos de antígenos K.⁽¹⁴³⁾ O início da síntese capsular se dá pela transferência da galactose-1-fosfato ou glicose-1-fosfato por Glicosiltransferases (GT) codificadas pelos genes *wbaP* e *wcaJ* para outro grupamento fosfato que será polimerizado pela Wzy e translocado para a superfície externa via canais Wza, Wzb e Wzc.^(144,145) Em *Klebsiella pneumoniae*, *wbaP* e *wcaJ* não coexistem na mesma cepa o

que altera a ligação da unidade de polimerização inicial.^(132,146) A perda de *wcaJ* em *Klebsiella pneumoniae* foi relacionada com o aumento na formação de biofilme.⁽¹⁴⁷⁾ Em isolados de alto risco (ST15, ST16, ST307 e ST258), *wcaJ* não foi encontrado, o que pode estar relacionado com o potencial aumentado dessas cepas em formar biofilme.⁽¹⁴⁸⁾

A biossíntese capsular pode ser regulada por outros genes que controlam a expressão de *cps*, dentre eles *rmpA*, *rmpA2*, *manB*, *manC*, *mgaA*, *kvgA*, *kvgS*, *rcaA* e *rcaB*. Esses genes podem aumentar a produção capsular que contribui para o fenótipo hiper mucóide do isolado, facilitando o estabelecimento da infecção no hospedeiro.⁽¹²⁷⁾ Linhagens Hv de *Klebsiella pneumoniae* apresentam um aumento no revestimento de exopolissacarídeo levando à formação de uma hipercápsula que contribui significativamente para a patogenicidade de *Klebsiella pneumoniae*.⁽¹⁴⁹⁻¹⁵¹⁾ A presença de *mgaA*, um dos genes necessários para o fenótipo hipercapsular em *Klebsiella pneumoniae*, foi encontrada em 98% das cepas invasivas versus 29% de cepas não invasivas.^(143,150) Também, linhagens de *Klebsiella pneumoniae* mutantes em *manC* e *wcaJ* apresentaram menor capacidade de estabelecer a colonização e foram menos eliminadas nas fezes em comparação com a cepa selvagem.⁽¹⁵²⁾

Atualmente, 138 antígenos K (K-locus) distintos foram identificados a nível molecular, mas apenas 79 são identificados pela tipagem sorológica tradicional.^(128,153-155) As cápsulas do tipo 1 e 2 (K1 e K2) estão presentes em cepas com alta patogenicidade associadas a infecções invasivas, como cepas do complexo clonal (CC) 23 (os complexos clonais serão discutidos no item 1.4) e K5 que foram encontradas em cepas associadas a abscessos hepáticos. Os demais tipos capsulares são pouco caracterizados quanto ao seu respectivo papel na patogenicidade, e as cepas MDR apresentam uma alta diversidade de tipos capsulares, não sendo restritos a um único tipo.^(47,156-159)

Além da CPS, as adesinas codificadas pelos genes *pgaABC* também apresentam um papel importante na formação de biofilme induzido por sais biliares e na colonização e infecção extra intestinal. Estes genes codificam o N-acetilglucosamina ligada à poli-b (PNAG), um substrato importante para o estabelecimento de *Klebsiella pneumoniae* no intestino através da formação de biofilme. Além disso, em modelos murinos, com a perda de *pgaC*, *Klebsiella pneumoniae* perdeu significativamente sua capacidade de estabelecer a colonização intestinal, e disseminar-se para os outros órgãos e desenvolver uma infecção sistêmica.⁽¹³¹⁾

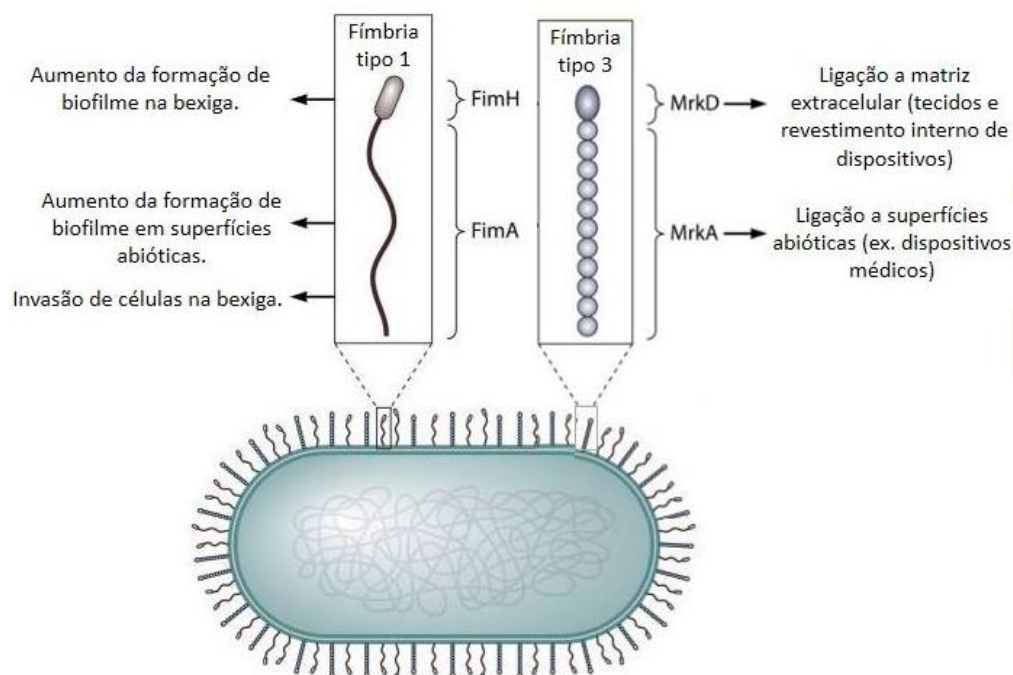
O antígeno O (O-locus) compõe o LPS bacteriano que além de estar

envolvido com a resistência à polimixina B, também está envolvido com a resistência à fagocitose em *Klebsiella pneumoniae*.^(153,160-162) Atualmente, existem 12 distintos tipos de O-locus, dos quais os tipos 1 e tipo 2 (O1 e O2) são comumente encontrados em isolados clínicos.⁽¹⁶³⁾

As fímbrias tipo 1 e 3 são estruturas adesivas ligadas à membrana externa da bactéria e amplamente caracterizadas em *Klebsiella pneumoniae* devido ao seu papel na interação patógeno-hospedeiro durante a infecção e na formação de biofilme em superfícies bióticas e abióticas.⁽¹²⁷⁾ Como mediadores da adesão de *Klebsiella pneumoniae*, as fímbrias representam um importante fator de patogenicidade bacteriana relacionadas com a infecção e a permanência dessa bactéria por longos períodos no ambiente, incluindo superfícies abióticas, como cateteres ou outros dispositivos médicos (Figura 3).^(127,164,165)

As fímbrias tipo 1 são filamentos formados pelas subunidades FimA e FimH, codificadas pelos genes *fimA* e *fimH*, que constituem a estrutura e a ponta adesiva do filamento, respectivamente.^(164,166,167) Estas fímbrias contribuem para o desenvolvimento de infecções no trato urinário e formação de biofilme na bexiga e em superfícies abióticas.^(165,166,168-170) As fímbrias do tipo 3, codificadas pelos genes *mrkABCDEF*, consistem em filamentos semelhantes a hélices formadas pelas subunidades MrkA e MrkD que formam a estrutura e a ponta adesiva do filamento, respectivamente. Já os genes *mrkBCE* codificam proteínas envolvidas na montagem da fímbria tipo 3 e a regulação da expressão dos outros genes, e o *mrkF* codificam proteínas responsáveis pela estabilidade das fímbrias na superfície.^(171,172) MrkA é a subunidade responsável pela ligação de *Klebsiella pneumoniae* a superfícies abióticas, como dispositivos plásticos, e MrkD é responsável pela ligação ao colágeno IV e V da matriz extracelular, normalmente exposta em tecidos danificados.^(173,174) Em um contexto onde há necessidade de ventilação mecânica, os tubos endotraqueais são importantes vias de acesso para a entrada de *Klebsiella pneumoniae* e estabelecimento de infecções podendo levar a pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAV), pois além de danificar tecidos do hospedeiro com a inserção dos tubos endotraqueais, a ventilação mecânica associada com a sedação profunda dificultam a depuração mucociliar.^(175,176) Estudos demonstram que as fímbrias do tipo 3 aderem *Klebsiella pneumoniae* à superfície plástica do tubo endotraqueal via MrkA antes e durante a inserção inicial. Após a inserção endotraqueal, os tubos ficam revestidos com colágeno ou outras proteínas da matriz extracelular derivadas dos danos no tecido do hospedeiro, facilitando a aderência

de *Klebsiella pneumoniae* ao tubo ou ao próprio tecido brônquico via MrkD, contribuindo para colonização endotraqueal e PAV.^(174,177) Diferente das fímbrias do tipo 1, que são requeridas em infecções do trato urinário, as fímbrias do tipo 3 parecem não contribuir para as infecções urinárias. Em contrapartida, as fímbrias do tipo 3 são requeridas na colonização traqueal e intestinais, pneumonias e formação de biofilmes em superfícies abióticas.^(152,165,170,174,178)



As fímbrias do tipo 1 são estruturas adesivas compostas principalmente de subunidades da FimA, com a subunidade da FimH na ponta. A subunidade FimH aumenta a ligação às células imunes levando ao aumento da ativação das células imunes e o recrutamento de neutrófilos. As fímbrias tipo 3 são compostas principalmente de subunidades MrkA e MrkD a qual se liga à matriz extracelular exposta em tecidos danificados e revestindo dispositivos internos, enquanto MrkA se liga a superfícies abióticas, como dispositivos médicos, tanto antes da inserção em pacientes quanto após a inserção quando revestida com matriz do hospedeiro.

Fonte: Traduzido e adaptado de Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. Microbiol Mol Biol Rev. 2016;80(3):629-61. Figure 4. Functions of type 1 fimbriae during *K. pneumoniae* infection and biofilm formation; p. 640; Figure 5. Functions of type 3 fimbriae during *K. pneumoniae* infection and biofilm formation; p. 640.⁽¹²⁷⁾

Figura 3. Funções das fímbrias tipo 1 e tipo 3 na infecção e formação de biofilme

1.3.2 Fatores de virulência

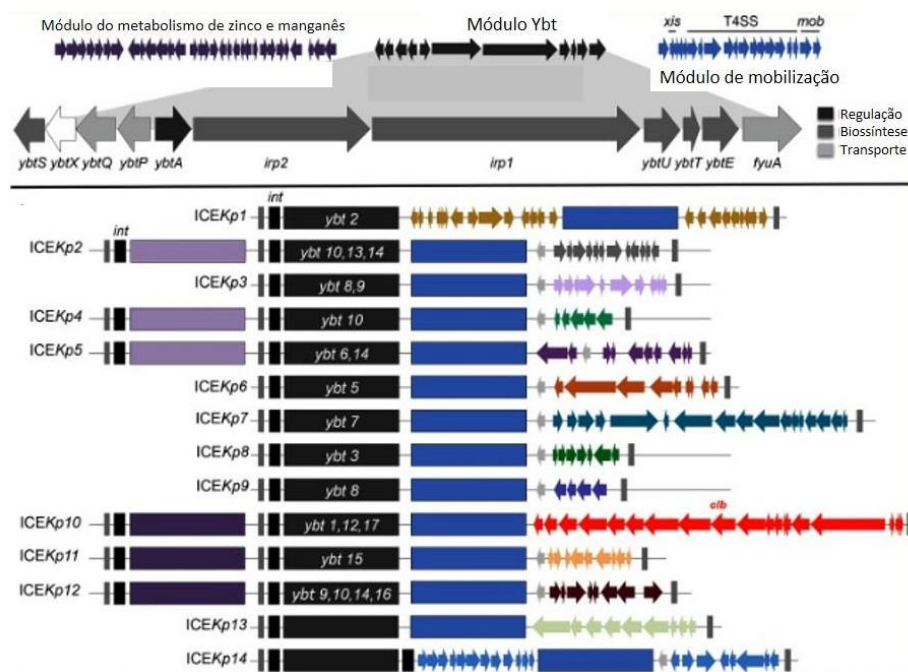
Os principais fatores associados com o aumento da virulência em *Klebsiella pneumoniae* e comprovados experimentalmente são os sistemas de aquisição

de ferro (sideróforos) adicionais presentes no genoma acessório e o policetídeo genotóxico colibactin (Clb).⁽¹⁷⁹⁻¹⁸²⁾

O ferro é um substrato essencial para o metabolismo e crescimento bacteriano, e os sideróforos atuam captando as moléculas de ferro do hospedeiro ou do ambiente e levando para dentro da bactéria.⁽¹⁷⁹⁾ *Klebsiella pneumoniae* apresenta a enterobactina, um sideróforo codificado pelo gene *ent* carregado no genoma central, capaz de captar o ferro das células do hospedeiro, no entanto, a enterobactina é inibida pela Lipocalin 2 (Lcn2) liberadas pelos macrófagos.⁽¹⁸³⁾ Já os sideróforos presentes no genoma acessório: *ybt*, aerobactin codificado pelos genes *iuc* e salmochelin codificado pelo gene *iro* conseguem captar o ferro das células do hospedeiro e evadir Lcn 2.^(127,130,180)

O Ybt está presente em 30 a 40% dos isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* e em 13% dos isolados de colonização.^(29,179) O sideróforo Ybt é codificado pelos genes *fyuA*, *irp1* e *irp2* e os genes *ybt*, constituindo o *locus* Ybt.⁽¹⁸⁴⁾ O *locus* Ybt juntamente com o sistema de secreção tipo 4 (T4SS – *Type 4 secretion system*) formam ilhas de patogenicidade denominadas elementos conjugativos e integrativos (ICE – *integrative conjugative elements*).⁽¹⁷⁹⁾ Em *Klebsiella pneumoniae*, esse conjunto de genes é denominado Elementos Conjugativos e Integrativos em *Klebsiella pneumoniae* (ICEKp) e podem ser transferidos para outras bactérias por transferência horizontal devido à presença do T4SS, o qual é responsável pela mobilização de DNA.^(179,185) A ICEKp é geralmente encontrada em linhagens Hv de *Klebsiella pneumoniae* e está significativamente associada a infecções comunitárias e hospitalares.^(29,179,186)

Até o momento, foram reportados 14 tipos de ICEKp em *Klebsiella pneumoniae* (ICEKp1-14) que diferem entre si pela disposição e tipos de *locus* Ybt, T4SS e o *locus* responsável pelo metabolismo de zinco e manganês (Figura 4). Além disso, o ICEKp10 apresenta o *locus* Clb responsável pela produção da Clb, uma proteína genotóxica presente em cepas Hv (discutida a seguir).⁽¹⁷⁹⁾



Estrutura genética das variantes de ICEKp (1-14). Locus de genes envolvidos no metabolismo de zinco e manganês (roxo escuro); locus de síntese de yersiniabactina Ybt (cinza escuro), locus de mobilização T4SS (azul). ICEKp 10 apresenta o locus adicional que codifica colibactina (Clb) (setas vermelhas).

Fonte: Traduzido e adaptado de Lam MM, Wick RR, Wyres KL, Gorrie CL, Judd LM, et al. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. Microb Genom. 2018;4(9):e000196. Figure 2. ICEKp structures; p. 4.⁽¹⁷⁹⁾

Figura 4. Estrutura dos elementos conjugativos e integrativos

Aerobactin e Salmochelin são encontrados em menos de 10% das *Klebsiella pneumoniae*.^(158,186) Esses sideróforos geralmente são encontrados em plasmídeos do tipo IncFIB, o qual tem sido reconhecido como plasmídeo de virulência de *Klebsiella pneumoniae* (Kp-pv), destacando pK2044 (carreando *iuc1* e *iro1*) e Kp52.145 pII (carreando *iuc2* e *iro2*). Esses plasmídeos são amplamente encontrados em cepas Hv de *Klebsiella pneumoniae* pertencentes aos complexos clonais (CC) 23, CC65, CC86 (pK2044) e CC66 e CC380 (Kp52.145 pII), e embora sejam plasmídeos não auto transferíveis, podem ser mobilizados por outros elementos conjugativos.^(158,186,187)

A Clb é codificada pelo gene *clb* presente no ICEKp10 é encontrada em aproximadamente 10% das *Klebsiella pneumoniae*.^(179,188) Este gene codifica um substrato genotóxico que induz danos no DNA das células do hospedeiro e contribui para a colonização da mucosa e intestino, infecções em diferentes órgãos e câncer colorretal.⁽¹⁸⁸⁻¹⁹⁰⁾ A Clb está associada a abscessos hepáticos provocados por isolados hipervirulentos pertencentes ao CC66 (100%) e CC23 (80%), e também em isolados hipervirulentos dos CC380 e CC65.⁽¹⁹¹⁾

1.4 Epidemiologia e estrutura populacional de *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae apresenta uma estrutura populacional complexa e diversa.⁽⁵⁾ No entanto, o entendimento sobre a estrutura e diversidade da população de *Klebsiella pneumoniae* é importante para interpretação dos dados de vigilância epidemiológica e para a implementação de novas estratégias de controle deste importante patógeno.^(5,8)

Com o avanço do sequenciamento do genoma completo (WGS – *Whole Genome Sequence*) e a grande quantidade de genomas de *Klebsiella pneumoniae* sequenciados, é possível compreender a dinâmica da população deste patógeno baseada na relação genética entre as linhagens e aquisição de mecanismos de resistência e virulência.^(7,8) Esta relação filogenética baseada em WGS pode ser compreendida pela comparação de um conjunto de genes ou polimorfismos (SNP) presentes no genoma central.⁽¹⁹²⁾

Os métodos de tipagem bacteriana baseados em sequência consistem no sequenciamento e comparação de um conjunto de genes pré-definidos do genoma central.⁽¹⁹²⁾ Na tipagem de sequência multilocus (MLST – *multilocus sequence typing*) de *Klebsiella pneumoniae* são avaliados fragmentos internos (aproximadamente 500pb) de sete genes conservados (genes *housekeeping*) relacionados ao metabolismo central (*rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB*, *tonB*). No MLST, o padrão de variação alélica destes sete genes define o tipo de sequência (ST – *sequence type*) bacteriano.⁽¹⁹³⁾ As cepas que possuem o mesmo ST ou com um alelo de diferença são agrupadas dentro do mesmo CC.⁽⁸⁾

Com a expansão do WGS, a tipagem multilocus foi ampliada para centenas ou milhares genes, resultando no sequenciamento de diversos genes no genoma central, conhecido como Tipagem multilocus do genoma central (cgMLST – *core genome multilocus sequence typing*).^(194,195) Em *Klebsiella pneumoniae*, são considerados do mesmo CC os isolados que compartilham 594 de 694 alelos do cgMLST.⁽¹⁵⁷⁾ Já na tipagem baseada em SNP, as sequências do genoma inteiro das cepas são comparadas com um genoma de referência, e aquelas com divergência menor ou igual a 0,5% na sequência de nucleotídeos são agrupados dentro de um mesmo CC.^(29,196,197)

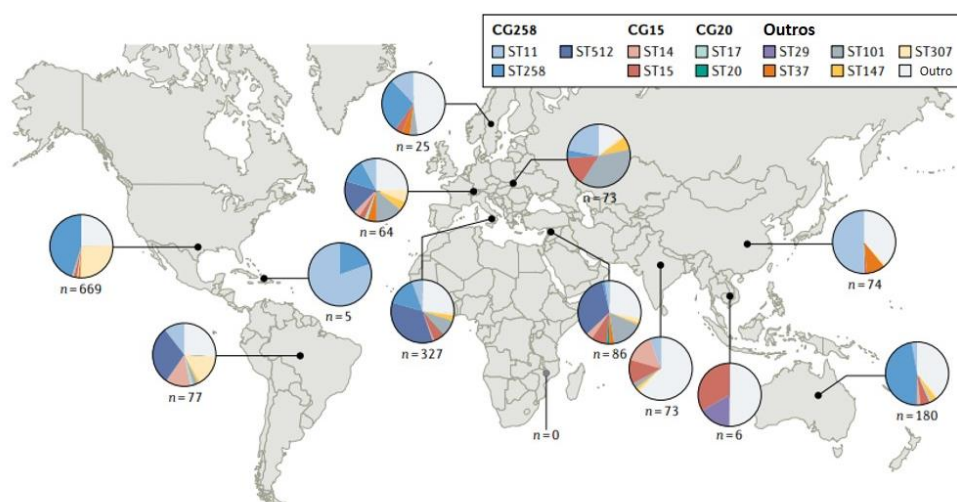
Além dos métodos baseados em sequência, a tipagem de *Klebsiella*

pneumoniae também pode ser feita por métodos baseados em padrão de banda como a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE – *Pulsed Field Gel Eletrophoresis*).^(198,199) Este método consiste na comparação do perfil de bandas gerados pela macro restrição enzimática do DNA, seguido pela eletroforese em gel de campo pulsado.^(198,200) Em *Klebsiella pneumoniae*, isolados que pertencem ao mesmo filogruppo apresentam uma similaridade maior ou igual a 90% no perfil de bandas gerados.⁽²⁰¹⁾ Este método é muito utilizado na discriminação de isolados em surtos devido ao seu alto poder discriminatório. No entanto, a portabilidade dos dados de PFGE são limitadas, pois não existe um banco de dados para estes resultados o que dificulta a comparação entre isolados de diferentes laboratórios.^(200,202) Já os métodos baseados em sequência (MLST e cgMLST) possuem um banco de dados centralizado (disponível em <https://pubmlst.org>) que possibilita a comparação com cepas de diferentes locais do mundo a partir dos ST dos isolados.⁽⁷⁾

Baseado no ST, é possível avaliar como os isolados que estão dispersos ao redor do mundo, e compará-los quanto a prevalência de determinados ST em diferentes locais.^(5,8,203,204) Ao lado disso, é possível identificar a carga genética de resistência e virulência e classificar os clones como problemas globais ou locais.^(5,7,8) Os clones de problemas globais são aqueles que carregam importantes mecanismos de resistência, virulência e são mundialmente dispersos, enquanto os clones de problemas locais estão restritos a uma determinada região.⁽⁵⁾

Em *Klebsiella pneumoniae*, os clones de alto risco estão frequentemente associados a isolados MDR que incluem cepas pertencentes ao CC 258, CC15, CC20, CC29, CC37, CC147, CC101 e CC307, e também cepas Hv pertencentes a seis CC: CC23, CC25, CC65, CC66, CC86 e CC380.^(7,19,55,205,206)

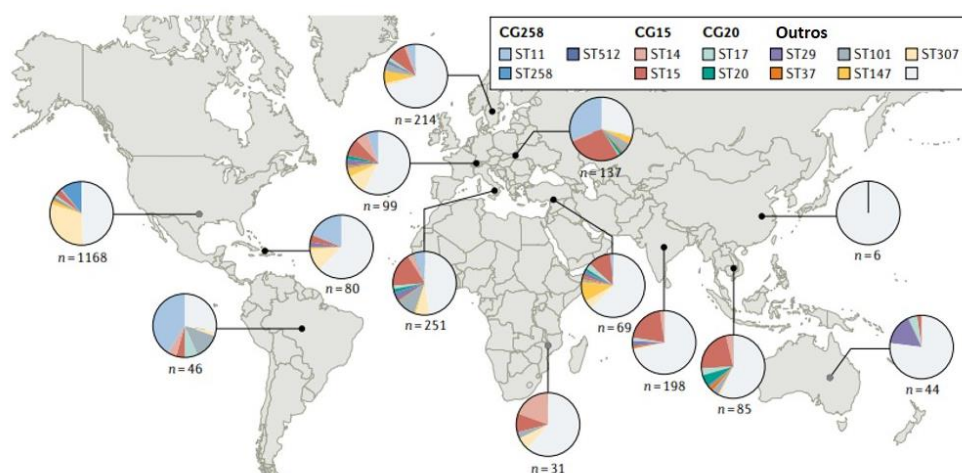
Embora disseminados mundialmente, alguns CC podem prevalecer em determinadas regiões. Por exemplo, as KpRC prevalentes nas Américas e sul da Europa pertencem principalmente ao ST258 e ST512, enquanto que na China e no restante da Europa a KpRC predominante é do ST11 (Figura 5).^(5,8) Já as KpRCef de terceira geração pertencem predominantemente aos ST14 e ST15 (CC15) e são geralmente encontrados na África do Sul, Europa e China, enquanto nas Américas, KpRCef pertencem principalmente a cepas do ST11 (Figura 6). No entanto, KpRC e KpRCef do ST307 têm emergido nas Américas e na Europa.^(5,8,205)



CC: complexo clonal. ST: tipo de sequência (*Sequence type*). *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos (KpRC) prevalentes nas Américas e sul da Europa pertencem principalmente a ST258 e ST512, enquanto que na China e no restante da Europa a KpRC predominante é do ST11.

Fonte: Traduzido e adaptado de Wyres KL, Lam MM, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat Rev Microbiol. 2020;18(6):344-59. Figure 3. Geographical distribution of *Klebsiella pneumoniae* clones harbouring resistance to carbapenems and third-generation cephalosporins. Part a; p. 349.⁽⁵⁾

Figura 5. Distribuição geográfica dos complexos clonais de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos



CC: complexo clonal; ST: tipo de sequência (*sequence type*). *Klebsiella pneumoniae* resistentes às cefalosporinas (KpRCef) de terceira geração pertencem predominantemente aos ST14 e ST15 (CG15) e são geralmente encontrados na África do Sul, Europa e China, enquanto nas Américas KpRCef pertencem principalmente a cepas do ST11.

Fonte: Traduzido e adaptado de Wyres KL, Lam MM, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat Rev Microbiol. 2020;18(6):344-59. Figure 3. Geographical distribution of *Klebsiella pneumoniae* clones harbouring resistance to carbapenems and third-generation cephalosporins. Part b; p. 349.⁽⁵⁾

Figura 6. Distribuição geográfica dos complexos clonais de *Klebsiella pneumoniae* suscetíveis aos carbapenêmicos e resistentes às cefalosporinas

No Brasil, *Klebsiella pneumoniae* ST437 representa um clone de problema local sendo frequentemente isolada em diferentes regiões do país.⁽¹⁰⁰⁾ Este ST, carreador de *bla*_{KPC-2} (72%), foi reportado em vários estados no Brasil, incluindo São Paulo, Rio de Janeiro, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Sul e foi associado a altas taxas de resistência aos carbapenêmicos.^(51,207,208) Isolados de *Klebsiella pneumoniae* ST16 foram reportados em hospitais de São Paulo e do Rio de Janeiro, e embora sejam encontrados ainda em baixa prevalência, este ST tem emergido como clinicamente relevante, pois carrega ao mesmo tempo mecanismos de resistência e virulência e está associado a altas taxas de mortalidade (95%).^(20,209,210) A convergência de fatores de virulência e resistência em *Klebsiella pneumoniae* não são comuns, e até o momento foram encontrados em cepas do ST23 restritas ao sul e sudeste da Ásia, principalmente.⁽²¹¹⁻²¹³⁾

A compreensão sobre a epidemiologia molecular de *Klebsiella pneumoniae* permite acompanhar a dinâmica das cepas sendo fundamental para direcionar o desenho e interpretação dos estudos experimentais e a implementação de estratégias de controle mais eficazes,⁽⁵⁾ podendo também auxiliar no tratamento empírico de infecções e descolonização, levando em consideração os tipos de isolados circulantes no ambiente e a carga genética que pode tornar a bactéria resistente durante o tratamento.

1.5 Classificação de patógenos como endêmicos e esporádicos

Em epidemiologia, os termos esporádico, endêmico, epidêmico, e pandêmico geralmente são atribuídos à ocorrência de casos de determinadas doenças.⁽²¹⁴⁾ Esporádica refere-se a uma doença que não ocorre frequentemente em um determinado local; endêmica refere-se à presença constante de uma doença ou agente infeccioso persistente em uma população dentro de uma determinada área geográfica. Quando a doença aumenta acima dos níveis esperados podem ser classificadas como: surtos, definidos por um agrupamento de uma doença infecciosa que ocorre em número acima do esperado para um determinado local e momento; epidemia refere-se a vários surtos que ocorrem em diferentes lugares e população e pandemia, quando a epidemia se espalha para diferentes continentes.^(214,215)

No entanto, com a caracterização molecular dos patógenos

infecciosos causadores das doenças, em estudos de epidemiologia molecular essas definições começaram a ser estendidas aos patógenos. Assim foi possível identificar que em algumas situações as infecções provocadas por determinados patógenos são causadas por um pequeno grupo de linhagens dentro de uma espécie.⁽²¹⁵⁾

Em bactérias, especificamente *Klebsiella pneumoniae*, a epidemiologia molecular permitiu a diferenciação dos genótipos baseados nos tipos de sequência, caracterizando das linhagens que carregam maior carga genética de resistência ou virulência e classificando as cepas como linhagens de alto risco que são problemas globais por estarem dispersos no mundo (epidêmicos), e clones considerados como problemas locais os quais são restritos a uma determinada região (esporádicos).⁽⁵⁾

Também, dentro de um ambiente específico como hospitais ou centros de saúde, podem existir linhagens patogênicas evolutivamente bem estabelecidas que prevalecem ao longo do tempo e conseguem se manter viáveis por anos, resistindo à diferentes pressões seletivas e conseguem colonizar ou infectar diferentes pacientes internados em anos diferentes. Estas linhagens podem ser consideradas endêmicas e o sucesso adaptativo geralmente está relacionada ao grande arsenal genético relacionado à resistência e virulência, diferente de outras linhagens que, embora aparecem em algum momento no hospital, não voltam a ser isoladas novamente em anos posteriores (esporádicas).^(5,7,8)

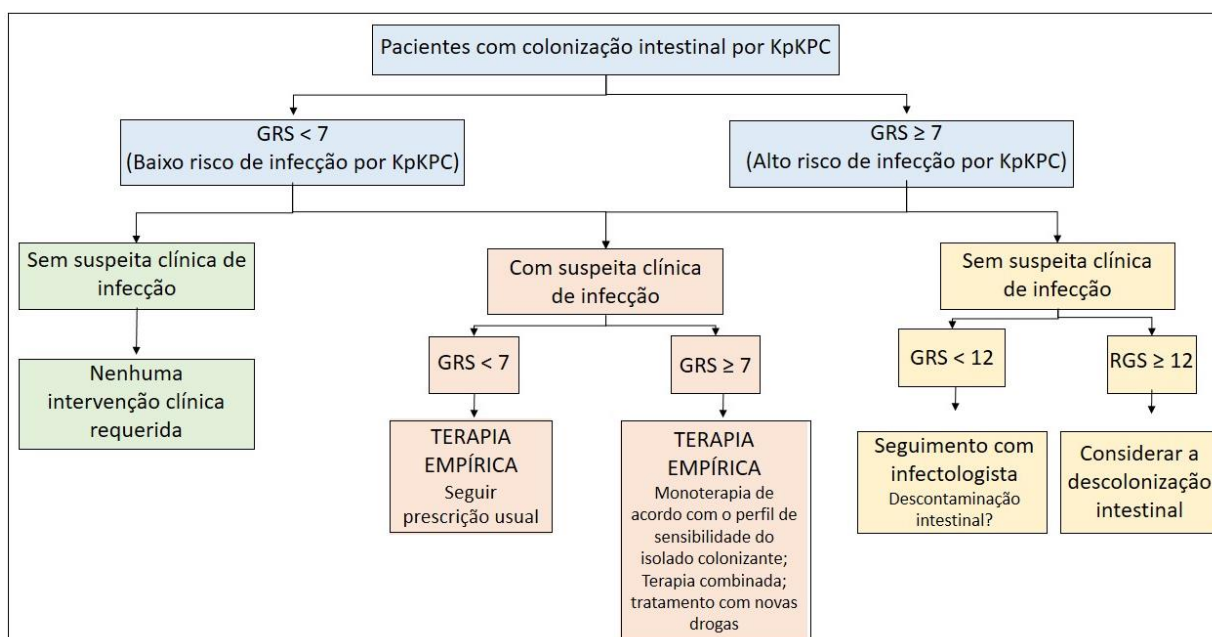
1.6 Fatores relacionados com a progressão para a infecção em *Klebsiella pneumoniae*

Com as limitadas opções de terapia antimicrobiana para tratar infecções provocadas por bactérias MDR, outras abordagens para combater essas infecções têm sido propostas pela comunidade científica, como vacinas e prevenção da colonização e infecção.⁽²⁻⁴⁾ Embora sejam empregadas medidas de controle de disseminação de bactérias MDR nos centros de saúde como lavagem das mãos, uso de luvas e isolamento do paciente colonizado, a eliminação em alta quantidade desses patógenos nas fezes de pacientes colonizados tornam essas medidas de controle menos eficazes.⁽²¹⁶⁾

A colonização intestinal por ERC geralmente é assintomática, o que torna o hospedeiro um reservatório silencioso que pode ser fonte de transmissão dessas

bactérias para o ambiente ou para outros hospedeiros.⁽²¹⁷⁻²¹⁹⁾ A microbiota intestinal tem um papel fundamental na resistência à colonização por patógenos. No entanto, o uso de antibióticos leva a alterações na microbiota do hospedeiro, diminuindo a diversidade microbiana no trato intestinal e favorecendo o crescimento e estabelecimento de patógenos.^(152,220,221) Esta indução à disbiose intestinal pode levar ao aumento da colonização por *Klebsiella pneumoniae* e desencadear o fenótipo de hospedeiros “superdisperssores” de KpRC no ambiente.⁽¹⁵²⁾ Estima-se que 20% dos pacientes colonizados por ERC sejam responsáveis por 80% da contaminação ambiental e transmissão destes patógenos.⁽²²²⁾

Além da disseminação no ambiente, a colonização intestinal por ERC tem sido considerada um fator de risco para o desenvolvimento de infecções.^(22,27,39,222,223) Alguns estudos epidemiológicos demonstraram que pacientes colonizados por ERC, incluindo KpRC e carreadores de *bla*_{KPC}, desenvolveram infecções por bactérias da mesma espécie, sugerindo ser a mesma cepa em ambos os episódios.^(23,224) Baseado nos fatores de risco do paciente, um *score* de risco foi proposto para tentar prever e evitar que as infecções ocorram em pacientes colonizados por KpRC (Giannella *score*).⁽²³⁾ Este *score* atribui valores a determinados fatores de risco do paciente, e com base na soma desses valores, sugere o risco ou não de bacteremia e a necessidade de intervenção precoce com antimicrobianos sozinhos ou combinados (Figura 7).



GRS: escore de risco de *Gianella* (*Gianella risk score*). As variáveis incluídas no GRS são: Admissão na unidade de terapia intensiva (2 pontos), Procedimentos abdominais invasivos (3 pontos), Quimioterapia / radioterapia (4 pontos) e Colonização em outros sítios além do intestino (5 pontos por cada site adicional).

Fonte: Traduzido e adaptado de Cano A, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, Gracia-Ahufinger I, Pérez-Nadales E, Causse M, et al. Risks of infection and mortality among patients colonized with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: validation of scores and proposal for management. Clin Infect Dis. 2018;66(8):1204-10. Figure 1. Management algorithm for patients colonized with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (KPC-Kp). p. 1208.⁽²²⁴⁾

Figura 7. Avaliação de risco e gerenciamento de pacientes colonizados com *Klebsiella pneumoniae* produtora de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

Contudo, além dos fatores relacionados ao hospedeiro, outros fatores relacionados à bactéria têm se mostrado importantes para prever uma potencial infecção e tentar evitá-la, dentre eles os determinantes de virulência, patogenicidade e resistência, abordados anteriormente, e a densidade da colonização.^(222,225) Recentemente, foi reportado que pacientes com fatores de risco semelhantes apresentaram diferentes cargas intestinais de *Klebsiella pneumoniae* carreadoras de *bla*_{OXA-48} (KpOXA), e os que desenvolveram infecções por KpOXA carregavam alta carga intestinal de KpOXA detectadas antes da infecção.⁽²⁷⁾

Sendo assim, os fatores relacionados à transição da colonização para a infecção ainda não estão esclarecidos. Um estudo *in vivo* demonstrou que o aumento da colonização intestinal por *Klebsiella pneumoniae* levou a uma diminuição na expressão de proteínas relacionadas a junção celular (*tight-junction*) como claudinas e ocludinas, permitindo assim que *Klebsiella pneumoniae* penetre e invada facilmente a mucosa. Além disso, o LPS presente na bactéria pode lesionar o tecido do hospedeiro

devido a indução da produção de óxido nítrico e COX-2. Também foi observado o desenvolvimento de colite devido ao aumento de potentes citocinas pró-inflamatórias, como COX-2, IL-6, IL-1 β e TNF- α , ativação da via de NF- κ B, altos níveis de peroxidação de lipídeos.⁽²²⁶⁻²²⁸⁾ Assim, na disbiose da microbiota intestinal onde a população de *Klebsiella pneumoniae* é predominante pode ocorrer inflamação com danos permanentes na mucosa.⁽²²⁷⁾ Por outro lado, a administração de bactérias como *Lactobacillus johnsonii*, reduziram a expressão de marcadores inflamatórios, aumentaram a expressão das proteínas relacionadas à junção celular, diminuindo a permeabilidade do intestino e assim demonstrando um efeito protetor na mucosa intestinal.^(227,229)

Estudos de descolonização intestinal empregando bactérias produtoras de ácido láctico têm apresentado resultados promissores e estão surgindo como uma alternativa aos antibióticos para a descolonização intestinal de pacientes com *Klebsiella pneumoniae* carreadoras de carbapenemase.^(230,231)

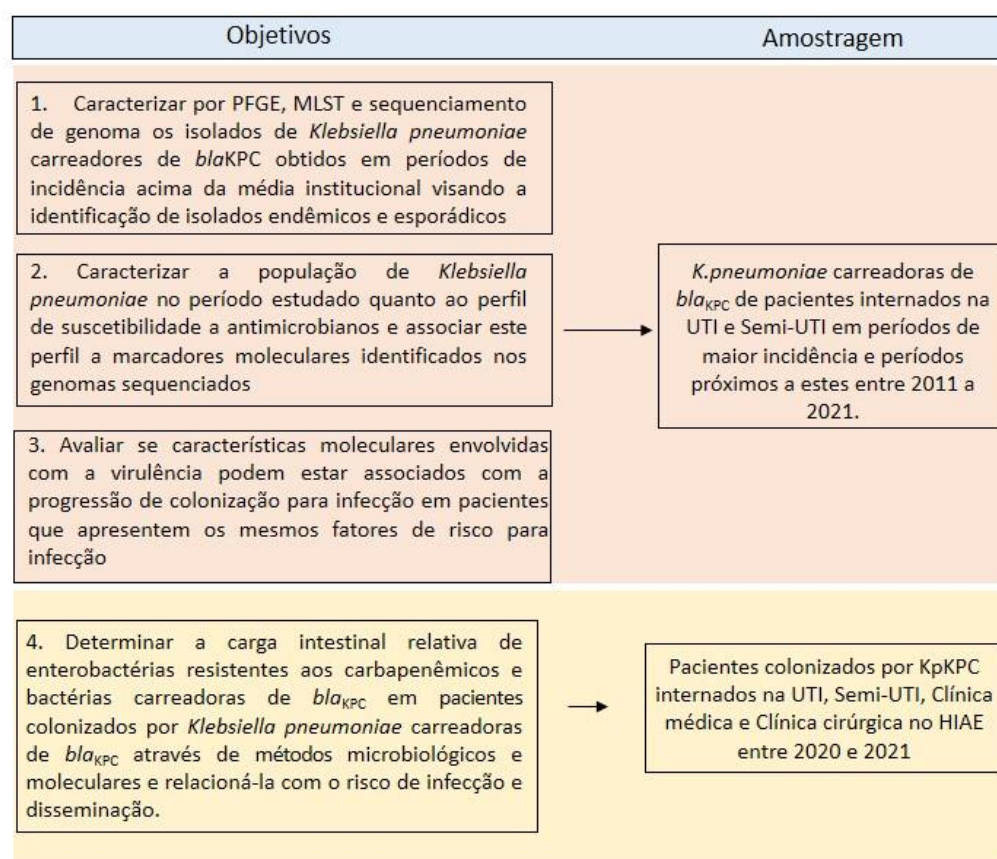
1.7 Objetivos

1. Caracterizar por eletroforese em gel de campo pulsado, tipagem de sequência *multilocus* e sequenciamento de genoma os isolados de *Klebsiella pneumoniae* carreadores de *bla*_{KPC} obtidos em períodos de incidência acima da média institucional visando a identificação de isolados endêmicos e esporádicos;
2. Caracterizar a população de *Klebsiella pneumoniae* no período estudado quanto ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e associar este perfil a marcadores moleculares identificados nos genomas sequenciados;
3. Avaliar se características moleculares envolvidas com a virulência podem estar associadas com a progressão de colonização para infecção em pacientes que apresentem os mesmos fatores de risco para infecção;
4. Determinar a carga intestinal relativa de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos carreadoras de *bla*_{KPC} em pacientes colonizados por *Klebsiella pneumoniae* carreadoras de *bla*_{KPC} por meio de métodos microbiológicos e moleculares e relacioná-la com o risco de infecção e disseminação.

2 MÉTODOS

2.1 Desenho do estudo

O desenho do estudo com os objetivos e as respectivas amostragens utilizadas para desenvolver cada objetivo estão representados na figura 8.



PFGE: eletroforese em gel de campo pulsado (*pulsed field gel electrophoresis*). MLST: tipagem de sequência multilocus (*Multilocus Sequence Typing*). UTI: unidade de terapia intensiva. Semi-UTI: unidade de terapia semi-intensiva KpKPC: *Klebsiella pneumoniae* carreadora de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. HIAE: Hospital Israelita Albert Einstein.

Figura 8. Desenho do estudo: objetivos e população considerada em cada análise

2.2 Seleção dos isolados bacterianos e dados microbiológicos de *Klebsiella pneumoniae*

Este estudo foi realizado no Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), um terciário de alta complexidade que conta com 706 leitos e atende, em média, 159 mil

pacientes/ano.

Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* considerados neste estudo foram identificados no setor de Microbiologia do Laboratório Clínico do HIAE entre 2007 a 2021. Estes isolados foram provenientes de diferentes espécimes clínicas, dentre elas sangue, lavado brônquico, secreção traqueal, abscesso abdominal, líquido ascítico e urina, e também de amostras de colonização intestinal obtidas por *swab* retal para a vigilância epidemiológica de bactérias MDR feita pelo Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH).

A identificação em nível de espécie foi realizada pelo sistema automatizado Vitek® 2 XL (bioMérieux, Craponne, França) e a avaliação do perfil antimicrobiano foi realizada pelo método de disco-difusão para imipenem e meropenem para as culturas de vigilância, e método automatizado para diferentes antibióticos, dentre eles Ceftazidima, Cefepima, Amicacina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Imipenem e Meropenem para as demais amostras clínicas. Os isolados provenientes de amostras de colonização intestinal foram testados somente para os carbapenêmicos, imipenem e meropenem. A interpretação dos resultados de antibiograma foi feita de acordo com o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*) vigente de cada ano.

Na rotina clínica, os *swabs* retais coletados para a vigilância de bactérias MDR são primeiramente semeados em placas contendo o meio de cultivo CHROMagar™ mSuperCARBA™ (Plastlabor, São Paulo, Brazil) e em seguida são guardados a 4°C por uma semana. CHROMagar™ mSuperCARBA™ é um meio de cultivo seletivo e diferencial para a detecção de ERC.⁽²³²⁾ As bactérias suscetíveis aos carbapenêmicos são inibidas, e as enterobactérias resistentes crescem como colônias de cor rosa (*Escherichia coli*) e azul (demais enterobactérias). Após esta triagem inicial em CHROMagar™ mSuperCARBA™, uma colônia é isolada, identificada, testada para os antibióticos como descrito anteriormente e também, em paralelo, é feita a detecção molecular dos genes que codificam carbapenemases, dentre eles *bla*_{KPC} (item 2.4).

Todos os dados microbiológicos (identificação, antibiograma e testes moleculares) dos isolados estão armazenados em dois sistemas distintos: LabTrak (até 2017) e Cerner Millennium® (a partir de 2018). A partir desses bancos de dados, foram gerados os relatórios de *Klebsiella pneumoniae* pela equipe do Setor de Microbiologia e disponibilizados para as nossas análises. Os dados contidos nestes relatórios disponibilizados são: data e sítio de isolamento de *Klebsiella pneumoniae*, perfil de

suscetibilidade aos antimicrobianos Ceftazidima, Cefepima, Amicacina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Meropenem e Imipenem, presença de *bla_{KPC}* e ala hospitalar dos pacientes com culturas positivas para *Klebsiella pneumoniae* internados no HIAE entre janeiro de 2007 e dezembro de 2021.

Como critério de inclusão para as nossas análises de prevalência, todas as culturas onde houve crescimento positivo para *Klebsiella pneumoniae* entre janeiro de 2007 a junho 2021 no HIAE foram consideradas, com exceção das culturas duplicadas. Foram consideradas duplicatas as *Klebsiella pneumoniae* provenientes do mesmo paciente, isoladas no mesmo dia, do mesmo sítio e com mesmo perfil de suscetibilidade. Com estes dados foram estimados: 1) total de *Klebsiella pneumoniae* no HIAE no período estudado; 2) número de isolados provenientes de diferentes tipos de amostras clínicas; 3) número de isolados resistentes e sensíveis aos carbapenêmicos e carreadoras ou não de *bla_{KPC}*; 4) número de pacientes colonizados por *Klebsiella pneumoniae* com infecções subsequentes.

É importante ressaltar que o nosso critério de definição de duplicatas é diferente do utilizado pelo SCIH, o qual define como duplicatas bactérias de mesma espécie isoladas do mesmo paciente dentro de 30 dias, independente do sítio de isolamento. Este critério de duplicatas é coerente com a proposta do SCIH que é avaliar a incidência (casos novos) de *Klebsiella pneumoniae*. Já para a proposta do nosso estudo, isolados de um mesmo paciente detectados dentro de 30 dias após a colonização foram incluídos, pois buscamos avaliar também se infecções subsequentes à colonização estariam associadas ao mesmo clone. Por isso, nossos dados epidemiológicos são considerados dados de prevalência.

2.3 Programa de vigilância de bactérias multirresistentes do Hospital Israelita Albert Einstein

O programa de vigilância de bactérias multirresistentes do hospital tem como objetivo: orientar os profissionais da saúde quanto aos cuidados na prevenção da disseminação de bactérias multirresistentes; reconhecer precocemente pacientes colonizados ou infectados por bactérias multirresistentes; instituir medidas de prevenção e controle; impedir a ocorrência de surtos ou transmissão cruzada de patógenos na instituição.

Os pacientes que são elegíveis para a pesquisa de bactérias multirresistentes no momento da admissão no HIAE são aqueles que possuem dispositivos invasivos (catéter venoso central, traqueostomia, drenos, etc.) ou feridas secretantes e são provenientes de outros hospitais onde permaneceram mais de 24 horas, instituições de longa permanência ou cuidado ambulatorial. Para pacientes domiciliares que possuem dispositivos invasivos e utilizaram antibióticos nos últimos 15 dias antes da admissão, também é indicado a pesquisa de bactérias multirresistentes no momento da admissão. Em todos esses casos, é coletado uma amostra de colonização intestinal por *swab* retal, os quais são encaminhados para a pesquisa de ERC (item 2.2) e *bla*_{KPC} (item 2.4) e enterococos resistentes à vancomicina.

Para pacientes já admitidos no hospital, a vigilância de ERC é realizada quizenalmente para pacientes internados na UTI a mais de sete dias. Em outras alas hospitalares, como a UTI pediátrica, pediatria, oncologia e semi intensiva, a vigilância por *swab* retal é feita a cada 30 dias em pacientes internados a mais de 15 dias.

Em caso de resultado positivo para ERC e *bla*_{KPC}, a equipe multiprofissional e a grupo de Controle de Infecção Hospitalar são acionados para as devidas precauções e monitoramento dos pacientes. Os pacientes são submetidos às medidas de controle de disseminação, como o isolamento e precaução de contato. Esta precaução é mantida até a terceira cultura negativa para ERC, feitas com intervalo de 1 semana entre elas.

2.4 Detecção molecular do gene *bla*_{KPC} em isolados de *Klebsiella pneumoniae*

Rotineiramente, a detecção do *bla*_{KPC} foi feita por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR – *Real Time-Polymerase Chain Reaction*) como preconizado pelo CDC.⁽²³³⁾ A extração de DNA dos isolados foi feita por kit PrepMan™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Em seguida, o DNA foi adicionado ao master mix TaqMan® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) contendo sondas marcadas com fluoróforos: fluoróforo FAM (*bla*_{KPC}) e fluoróforo CY5 (16S RNA ribossômico).⁽²³³⁾ O material é colocado em um cartucho microfluídico e processado pelo equipamento BD MAX™ (Becton, Dickinson and Company) no módulo PCR Only. Caso o isolado apresente gene *bla*_{KPC}, as sondas

hibridizam-se com a sequência complementar e uma fluorescência é emitida e será captada pelo equipamento. O resultado é liberado de maneira qualitativa: presença ou ausência do gene.

2.5 Taxa de prevalência de *Klebsiella pneumoniae*

As taxas de prevalência (TDP) de *Klebsiella pneumoniae* foram calculadas considerando o número de pacientes-dia no HIAE entre 2007 a 2020. Os dados de pacientes-dia foram gentilmente cedidos pelo SCIH. O cálculo de TDP por ano foi feito pela razão entre o número de isolados de *Klebsiella pneumoniae* encontrados no HIAE e o número de pacientes-ano e multiplicado por 1000 para a representação gráfica.

Os nossos dados foram comparados às taxas de incidência (TDI) de ERC no HIAE entre 2010 e 2020 disponibilizados também pelo SCIH. Esses dados de TDI de ERC foram considerados para a definição dos períodos de maior incidência de ERC no HIAE entre 2010 a 2020 que são caracterizados como períodos onde as TDI de ERC ficaram acima da média institucional.

2.6 Identificação de casos de colonização e infecção por *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos

Nesta análise, os isolados de colonização foram considerados aqueles obtidos por *swab* retal e infecção aqueles obtidos de sítios estéreis como sangue, lavado brônquico, líquido ascítico, secreção de abdômen e também secreção traqueal e urina. As investigações de pacientes colonizados por KpRC com infecções posteriores foram feitas a partir dos relatórios cedidos pelo Setor de Microbiologia onde estavam os dados de todas as culturas positivas para *Klebsiella pneumoniae* no HIAE entre 2007 a 2020. Estes relatórios continham as informações do número de prontuário, ala hospitalar, data e sítio de isolamento, detecção de *bla*_{KPC} e antibiograma para Ceftazidima, Cefepima, Amicacina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Meropenem e Imipenem.

Primeiramente foram selecionados somente os pacientes colonizados por KpRC através da filtragem por sítio de isolamento (*swab* retal) e resistência à

imipenem e meropenem. Em seguida, os pacientes que apresentaram KpRC na colonização intestinal foram divididos em dois grupos: Pacientes que apresentaram um que apresentaram mais de um tipo de cultura extraintestinal positiva para KpRC posterior à colonização dentro de 30 dias (Grupo 1) e pacientes que apresentaram somente o episódio de colonização, sem infecções posteriores (Grupo 2).

A partir da análise desses dados foi obtido o número de pacientes internados entre 2007 e 2020 com infecções subsequentes à colonização por KpRC (carreadoras ou não de *bla_{KPC}*) e o número de pacientes que só apresentaram a colonização por KpRC (carreadoras ou não de *bla_{KPC}*). É importante destacar que embora a análise epidemiológica foi feita para períodos compreendidos entre 2007 a 2020, as análises referentes a *Klebsiella pneumoniae* carreadora de *bla_{KPC}* foram realizadas a partir de 2010, ano no qual iniciaram-se as análises moleculares para *bla_{KPC}* no HIAE e para os quais obtivemos os dados e os isolados de KpKPC.

2.7 Seleção dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* para análises experimentais

Para caracterizar a população de *Klebsiella pneumoniae* carreadora de *bla_{KPC}* circulante no hospital, evitando isolados comunitários, as análises moleculares foram restritas a KpKPC de pacientes que estavam internados na UTI e Semi intensiva nos períodos de maior prevalência de ERC e períodos próximos a estes entre 2011 e 2021.

Além disso, os isolados bacterianos foram selecionados sob duas condições: disponibilidade dos isolados no banco de cepas do Laboratório Clínico e viabilidade da bactéria. Apenas um isolado por paciente foi incluído na análise, correspondendo à primeira amostra de colonização e/ou infecção positiva para KpKPC (Apêndice 1).

2.8 Avaliação da viabilidade e estoque dos isolados de *Klebsiella pneumoniae*

Os isolados bacterianos provenientes das amostras clínicas são sistematicamente guardados pela equipe do Setor de Microbiologia no banco de cepas. Após serem isolados das amostras clínicas e identificados, alguns isolados são

guardados em *freezer* -80°C em criotubos contendo 1mL de meio de cultivo com glicerol (concentração final de 20%).

Depois de selecionados os isolados de *Klebsiella pneumoniae* de interesse no banco de cepas, 50µL dos inóculos foram semeados por esgotamento em placas de ágar sangue e incubadas a 37°C por 18 horas. O crescimento foi observado pelo aparecimento de colônias no meio de cultura.

Em seguida, uma colônia isolada foi inoculada em 1mL de meio Luria Bertani (LB) (Kasvi, São Paulo, Brasil) líquido contendo 1µg/mL de Meropenem e incubado a 37°C por 18 horas. No dia seguinte, o inóculo foi transferido para criotubos contendo glicerol a uma concentração final de 20% e estocado a -80°C até a realização dos experimentos.

2.9 Extração de DNA dos isolados bacterianos

O DNA dos isolados de KpKPC foram extraídos como descrito por Salvà-Serra et al., em 2018.⁽²³⁴⁾ Os inóculos foram feitos a partir das suspensões bacterianas puras estocadas (item 2.8). Os inóculos foram feitos em microtubos de 2mL contendo 1mL meio de cultivo LB (Kasvi, São Paulo, Brasil) e 1µg/mL de Meropenem e deixados em estufa a 37°C por 18 horas a 180 rotações por minuto (rpm). No dia seguinte, os inóculos foram centrifugados a 12.000rpm por 1 minuto e o meio de cultivo foi retirado; os precipitados foram lavados uma vez com água ultra-pura estéril para a retirada de resquícios de meio de cultura. Em seguida, os precipitados foram ressuspendidos em 600µL *Ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA) (Merck, Darmstadt, Alemanha) com Salina (Merck, Darmstadt, Alemanha) (0,01M EDTA; 0,15M Salina, pH=8,0); foram adicionados 80µL de *Sodium dodecyl sulfate* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) em uma concentração de 25% e os microtubos foram submetidos a agitação em vórtex. Após a agitação em vórtex na velocidade máxima, os microtubos foram incubados a 65°C por 10 minutos, sendo agitados em vórtex uma vez durante este tempo. Em seguida, 250µL de cloreto de sódio (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) (4M) e 400µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foram adicionados e misturados por vórtex; os microtubos foram colocados em agitador orbital a 1.400rpm por 15 minutos. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 13.000g por 15 minutos, e após a centrifugação a camada superior foi transferida para um novo microtubo de 2mL

contendo 400µL de clorofórmio. A solução foi misturada vigorosamente e colocada em centrífuga a 13.000g por 15 minutos; esta etapa do clorofórmio foi repetida uma vez mais. Aproximadamente 500µL da camada superior foi transferida para um novo microtubo contendo 45µL de Acetato de Sódio (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) a uma concentração de 3M e 300µL de isopropanol (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) gelado (4°C). Os microtubos foram delicadamente invertidos várias vezes até aparecer o DNA precipitado e então foram centrifugados a 13.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado. Após a completa evaporação isopropanol feita em Speed Vac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), o *pellet* de DNA foi ressuscitado em 50µL de low-TE (1mM Tris; 0,1mM EDTA, pH=8,0), tratado com RNase (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) (10µg/mL) por 15 minutos a 37°C seguido de 15 minutos e 65°C para inativação da RNase. O DNA extraído foi estocado a -20°C até a realização dos experimentos.

2.10 Eletroforese de campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis*)

O PFGE foi feito como descrito previamente.⁽²⁰⁰⁾ Os inóculos bacterianos foram feitos em tubos contendo 5mL meio de cultivo LB e 1µg/mL de Meropenem (Pfizer, São Paulo, Brasil) e deixamos em estufa 37°C por 18 horas a 180rpm. No dia seguinte, os inóculos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000rpm. O sobrenadante foi retirado e o precipitado contendo as células bacterianas foram ressuscitados em 1mL de solução salina (NaCl 0,7%) e centrifugado por 5 minutos a 3.000rpm para a retirada de resquícios de meio de cultura. O sobrenadante foi retirado e 50µL de salina foi adicionado em cada precipitado. Em um outro microtubo, foi adicionado 300µL de tampão TEM (EDTA 0,5M pH 7, EDTA 0,5M pH 8, Tris base 1M pH 7, Tris base 1M pH 8, NaCl 4,0 M, água destilada), 340µL de agarose *low melt* 2% e 7µL da amostra. Rapidamente, uma alíquota dessa solução foi adicionada nos moldes de acrílico para PFGE da *Bio-Rad Laboratories* para a formação dos *plugs*. Os moldes contendo as amostras foram incubadas 15 minutos a 4°C. Em seguida, os *plugs* foram cuidadosamente removidos dos moldes e colocados em placas de microdiluição de 12 poços contendo tampão EC (EDTA 0,5M pH 7,0, EDTA 0,5M pH 8,0, Tris base 1M pH 7,0, Tris base 1M pH 8,0, NaCl, N- lauril sarcosil, Brij 58, Deoxicolato de sódio, água destilada) e incubados por 5 horas à 37°C. Os *plugs* foram lavados 2 duas vezes com

tampão CHEF TE 1X (EDTA 0,5M pH 7, EDTA 0,5M pH 8, Tris base 1M pH 7,0, Tris base 1M pH 8,0, água destilada), com 30 minutos de intervalo entre as lavagens e após isso os *plugs* foram cortados 1/3 do tamanho e colocados em uma placa de microdiluição de 96 poços contendo 180µL de tampão ES (EDTA 625mM pH 9,3, N-lauril sarcosil 5%) e 20µL da enzima Proteinase K (Uniscience Corporation, Miami, Flórida, USA). Esta placa contendo os *plugs* foi incubada por 18 horas a 50°C.

No dia seguinte, o tampão ES e a proteinase K foram removidos e adicionado 200µL de tampão CHEF TE 1X para a lavagem dos *plugs*. Esta lavagem foi repetida 4 vezes com 1 hora de intervalo entre as lavagens. Foram adicionados aos *plugs* 200µL de tampão CHEF TE 1X e armazenados a 4°C até o momento da digestão.

A próxima etapa consiste na preparação dos *plugs* para a digestão enzimática com enzima de restrição. O tampão CHEF TE 1X foi retirado e os *plugs* foram lavados 4 vezes com 200µL do tampão DNS (Tris base 1M pH 8, Cloreto de magnésio 1M, H₂O destilada) com 1 hora de intervalo entre as lavagens. Após isso, o DNS foi substituído por uma solução contendo 10µL de tampão da enzima de restrição e 40µL de água ultra pura e os *plugs* foram incubados por 1 hora a 4°C. Em seguida, esta solução contendo o tampão da enzima foi substituída por outra preparada da mesma maneira, porém contendo 5U da enzima de restrição SpeI (New England Biolabs). A placa foi incubada por 1 hora à 4°C e logo após, incubada à 37°C por 18 horas.

No dia seguinte, os *plugs* foram retirados dos poços da placa e foram colocados nos poços do gel de agarose 1%. Em cada gel foi incluído ainda um padrão de peso molecular Lambda PFG *Ladder* (Ladder sigma; New England Biolabs). O gel na concentração de 1% foi preparado com agarose ultrapura e solução TBE 0,5X (TBE 10X e água destilada – EDTA, Tris base, Ácido bórico, água destilada). A corrida foi realizada no aparelho Bio-Rad CHEF DR III com 2100mL de tampão TBE 0,5X (TBE 10X e H₂O destilada – EDTA, Tris base, Ácido bórico, água destilada) nas seguintes condições: 6V/cm, com tempos de pulso variando de 6 a 60 segundos por 23 horas. Ao término da corrida, o gel de agarose foi retirado do aparelho CHEF DR III e ficou imerso em brometo de etídeo por 30 minutos. Em seguida, o gel foi visualizado no fotodocumentador.

A análise foi realizada através da comparação do padrão de bandas obtidas para cada isolado. Os perfis foram analisados manualmente e através do *software* Bionumerics versão 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). O agrupamento foi criado utilizando o grupo de pares não ponderados com médias aritméticas (UPGMA) com tolerância customizada de 1% e otimização de 0,8%. De acordo com o coeficiente

de similaridade (DICE) reportado por Elbir et al., para *Klebsiella pneumoniae*, os isolados com perfil de banda maiores ou iguais a 90% de similaridade foram considerados iguais.⁽²³⁵⁾

2.11 Classificação dos isolados como endêmicos e esporádicos

Para a caracterização da população de KpKPC deste trabalho, os isolados foram classificados em duas categorias: endêmicos e esporádicos. Baseados na relação genética avaliada pelo padrão de bandas gerados por PFGE, os isolados endêmicos foram aqueles que apresentaram mais de 90% de similaridade no padrão de bandas, e foram isolados de pacientes diferentes em mais de uma ocasião ao longo do tempo (anos diferentes). Já os isolados esporádicos foram aqueles perfis de PFGE de isolados que apareceram em um ou mais pacientes internados no mesmo período e não foram novamente identificados em anos posteriores.

2.12 Sequenciamento de genoma

Dos isolados de KpKPC selecionados conforme o item 2.7, pelo menos uma amostra por paciente foi selecionada para o sequenciamento de genoma. O DNA genômico foi extraído conforme o item 2.9, e a concentração e qualidade foram verificadas por espectrofotômetro NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Em microtubos de 200µL, as amostras foram ajustadas para uma concentração final de 300ng com água livre de nuclease para um volume final de 35µL.

A fragmentação do DNA genômico para a construção das bibliotecas foi feita por restrição enzimática utilizando o kit de reagentes Ion Shear Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Aos 35µL de DNA (300ng) foram adicionados 5µL do tampão e 10µL de Enzyme Mix II disponibilizados no kit. Depois de homogeneizadas com pipeta (*up/down*), as amostras foram colocadas no termociclador a 37°C por 15 minutos, sem aquecimento da tampa, com o volume final de 50µL ajustado no termociclador. Após este tempo foi adicionado 5µL do reagente para parar a atividade enzimática. Em novos microtubos de 1,5mL foram adicionados os 55µL

da amostra juntamente com 99µL de *beads* magnéticas (Aligent, Santa Clara, California, Estados Unidos) com ponteira de baixa retenção. As amostras foram homogeneizadas com pipeta e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram colocadas em uma estante magnética e deixadas por 5 minutos. Após este tempo, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e descartado, e as *beads* foram lavadas com 500µL de etanol 70%. Os microtubos foram rotacionados duas vezes para que as *beads* passassem pelo etanol. Esta lavagem com etanol foi feita duas vezes. O etanol foi retirado e o microtubo permaneceu aberto para completa evaporação do etanol. Em seguida, foram adicionadas às *beads* magnéticas, 25µL de low TE disponibilizado no kit e as *beads* foram incubadas em temperatura ambiente por 2 minutos. Depois os microtubos foram colocados novamente na estante magnética e os 25µL de low TE contendo o DNA fragmentado foi recuperado e colocado em novos microtubos.

As bibliotecas foram construídas utilizando o kit Ion Plus Fragment Library (Ion Torrent™) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Neste passo foram ligados os adaptadores e os *barcodes* nos fragmentos de DNA para serem identificados posteriormente. Para cada amostra foi preparada uma solução contendo: 10µL de tampão ligase, 8µL de Polimerase *nick repair*, 2µL de adaptadores P1, 2µL de dNTPs, 2µL DNA ligase, 2µL de um *barcode* previamente determinado e água para um volume final de 75µL. Em seguida, as amostras foram colocadas no termociclador a 25°C por 15 minutos e 75°C por 5 minutos. Em novos microtubos de 1,5mL foram adicionados os 100µL da amostra juntamente com 117,6µL de *beads* magnéticas com ponteira de baixa retenção. Esse volume de *beads* magnéticas é indicado pelo fabricante para fragmentos de 200-300pb. As amostras foram homogeneizadas com pipeta e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram colocadas em uma estante magnética e deixadas por 5 minutos. Após este tempo, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e as *beads* foram lavadas duas vezes com 500µL de etanol 70% como descrito anteriormente. Então, as amostras foram eluídas em 20µL low TE.

A seleção dos fragmentos de 300pb foi feita por e-Gel™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Neste passo, 20µL de cada amostra foi adicionado a 2,5µL de *loading buffer* e 2,5µL de água livre de nuclease. Os 25µL de amostra e 25µL de padrão de bandas foram submetidos a uma eletroforese em um gel (e-Gel) próprio para esta finalidade e quando os fragmentos de tamanho esperado alcançaram o poço da coleta, estes foram recolhidos com pipeta (aproximadamente

25µL) e colocados em um novo microtubo.

Os fragmentos de interesse foram amplificados e selecionados por PCR. Em cada amostra (25µL) foram adicionados 100µL de Platinum Supermix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) e 5µL de *primer mix*. Neste passo, foram amplificados os fragmentos contendo o adaptador P1 e o *barcode* em cada extremidade. Em seguida, ao produto da PCR foram adicionados 156µL de *beads* magnéticas. As amostras foram homogeneizadas com pipeta e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram colocadas em uma estante magnética e deixadas por 5 minutos. Após este tempo, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e as *beads* foram lavadas duas vezes com 500µL de etanol 70% como descrito anteriormente. Por fim, as amostras foram eluídas em 20µL low TE.

As bibliotecas foram quantificadas no Bioanalyzer 2100, usando o kit High Sensitivity DNA (Agilent™, Santa Clara, Califórnia, USA). A amplificação clonal das bibliotecas foi realizada usando Ion PI™ Hi-Q™ Chef Kit (Ion Torrent™) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) e o DNA sequenciado usando o Ion PI™ Chip Kit v3 e o kit Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 (Ion Torrent™) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) no sequenciador Ion Proton (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

2.13 Montagem dos genomas

Para a montagem *de novo* dos genomas foram utilizados *scripts* desenvolvidos pelo nosso grupo. A qualidade das sequências foi avaliada por FastQC versão 0.11.2. Para remover sequências com baixa qualidade e o restante dos adaptadores as sequências foram trimadas usando Trimmomatic versão 3.4. A montagem dos genomas foi realizada usando SPAdes versão 3.15.2. Os parâmetros de qualidade foram avaliados pelo programa Qualimap e a cobertura foi avaliada utilizando a cepa de *Klebsiella pneumoniae* HS11286 como referência.

2.14 Determinação dos tipos de sequências (*sequence type*)

A tipagem de MLST consiste na análise das regiões internas de 7

genes conservados em *Klebsiella pneumoniae* (Tabela 1).⁽¹⁹³⁾ Para a detecção dos ST nos nossos isolados, foi utilizado o *script* disponível no Github Software (<https://github.com/tseemann/mlst>) para *Klebsiella pneumoniae* o qual utiliza o esquema de MLST desenvolvido pelo Instituto Pasteur (<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/>).

Tabela 1. Genes utilizados para tipagem de sequência *multilocus*

Gene	Proteína codificada	Tamanho do fragmento (pb)
rpoB	Beta-subunit of RNA polymerase B	501
gapA	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	450
mdh	Malate dehydrogenase	477
pgi	Phosphoglucose isomerase	432
phoE	Phosphoporine E	420
infB	Translation initiation factor 2	318
tonB	Periplasmic energy transducer	414

Pb: pares de base.

2.15 Determinação dos elementos genéticos de virulência e resistência

Para a detecção dos genes de virulência, foi utilizado o banco de dados de fator de virulência (VFDB – *Virulence Finder Data Base*).⁽²³⁶⁾ Para a detecção dos genes de resistência, foi utilizado o banco de dados AMRFinderPlus disponível no Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI – *National Center for Biotechnology Information*).⁽²³⁷⁾ A presença desses genes foi avaliada através do alinhamento de sequência disponível nos bancos de dados com os genomas de *Klebsiella pneumoniae* previamente montados (item 2.13). Para as mutações cromossômicas relacionadas com a resistência à ciprofloxacina nos genes *gyrA* e *parC*, o alinhamento das sequência por Blast e as mutações foram verificadas manualmente.

2.16 Determinação da carga intestinal relativa de Enterobactérias Resistentes aos Carbapenêmicos e bactérias carreadoras de *bla_{KPC}*

A carga intestinal relativa de bactérias carreadoras de carbapenemases foi determinada de maneira semelhante à reportada previamente em outros trabalhos para bactérias carreadoras de *bla_{OXA-48}*.⁽²⁷⁾ Para isso, dois métodos de quantificação previamente estabelecidos e validados foram utilizados: microbiológico e

molecular.⁽²³⁸⁾

O método microbiológico avalia a quantidade relativa de ERC em relação a microbiota total aeróbia. Para tanto as amostras são cultivadas em meios seletivos para o crescimento de ERC e, também, em meios não seletivos como ágar sangue, respectivamente,⁽²³⁸⁾ na presença de oxigênio. Já os métodos de quantificação molecular de bactérias carreadoras de genes de resistência na carga intestinal são feitos por PCR quantitativo (qPCR), onde um determinado gene relacionado ao patógeno, como *bla_{KPC}* é quantificado e relacionado à microbiota total (aeróbia e anaeróbia) avaliada pela quantidade de 16S RNA ribossômico (16S rRNA).^(27,230,238) Esses métodos de quantificação da carga intestinal (microbiológicos e moleculares) apresentam uma boa correlação entre si e podem ser feitos a partir de amostras coletadas por *swab* retal sem prejuízo na qualidade do resultado quando comparados a quantificação realizada em amostras de fezes.⁽²³⁸⁾

2.16.1 Seleção de amostras para determinação da carga intestinal relativa de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e bactérias carreadoras de *bla_{KPC}*

Os *swabs* retais utilizados neste estudo foram coletados como parte do programa de vigilância de bactérias MDR entre junho de 2020 e junho de 2021. Os *swabs* retais foram coletados dos pacientes internados no HIAE e enviados em meio Amies para o processamento. Ao serem recebidos no Setor de Microbiologia, esses *swabs* foram processados como descrito no item 2.2. Após serem processados na rotina clínica, esses *swabs* foram guardados a 4°C, e dentro de uma semana foram recolhidos para as nossas análises. Os dados clínicos e microbiológicos referentes a estas amostras foram obtidos por consulta ao sistema utilizando o número de acesso da amostra.

As amostras nas quais foram confirmadas a presença de KpKPC foram selecionadas para os nossos testes. Os pacientes foram acompanhados semanalmente durante 30 dias após a data da coleta do *swab* retal para a identificação de infecções por KpKPC. O critério de infecção utilizado aqui está descrito no item 2.6. Pacientes que apresentavam duas ou mais amostras de colonização, apenas a primeira amostra foi selecionada.

2.16.2 Método microbiológico para determinação da carga intestinal relativa de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos

Os *swabs* retais selecionados conforme descrito no item anterior foram eluídos em 0,5mL de tampão TE 1X (Tris-EDTA; Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Desta eluição foram utilizados 10µL para uma diluição seriada em solução salina (0,9%) de 10^{-1} a 10^{-6} ; 10µL de todas as diluições foram semeadas em placas de ágar soja tríptica suplementadas com 5% de sangue de carneiro (Biomeriux, Crapronne, França) (ágar sangue) e em placas CHROMagar™ mSuperCARBA™ (CHROMagar, Paris, França). Ambas as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 18 horas e as eluições dos *swabs* retais foram armazenadas a -20°C para posterior análise molecular.

As placas de ágar sangue foram utilizadas para estimar o número de bactérias aeróbias totais e viáveis (BAT) presentes na amostra. Já as placas de CHROMagar™ mSuperCARBA™ foram utilizadas para estimar o número de ERC presentes na amostra. Após a incubação, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi contado em ambas as placas.

Esses valores foram transformados em UFC por mL (UFC/mL) através da multiplicação do número de colônias pela diluição na qual foi feita a contagem, e em seguida, foram multiplicados por 100 para determinar a contagem em 1mL. A quantidade relativa de ERC foi estimada pela razão entre ERC e BAT. Estes resultados foram expressos em log de ERC/BAT para a representação gráfica.

2.16.3 Método molecular para determinação da carga intestinal relativa de bactérias carreadoras de *bla*_{KPC}

O DNA foi extraído de suspensões retais de *swab* que estavam armazenadas a -20°C (item anterior). Dos 0,5mL totais da suspensão do *swab* em TE 1X, 10µL foram utilizados para fazer as diluições para o teste microbiológico e 250µL foram utilizados para fazer a extração de DNA para os teste moleculares, restando ainda 240µL da suspensão do *swab* em estoque (-20°C). A extração de DNA da suspensão bacteriana foi feita por fervura; 250µL da suspensão foi colocada em um novo microtubo de 1,5mL e colocado em termobloco Eppendorf ThermoMixer® C (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) a 100°C por 10min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a

12.000rpm por 5min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. As concentrações de DNA foram medidas usando o espectrofotômetro NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) e as amostras foram armazenadas a -20°C.

A qPCR em tempo real (qPCR) foi realizada em uma reação *multiplex* utilizando sondas Dual labeled BHQ probes (BHQp) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). As reações de qPCR foram feitas com sondas, pois são mais específicas quando comparadas às feitas com *Sybr* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), por exemplo. No processo de desnaturação do DNA, as sondas são aneladas a uma sequência complementar (gene alvo) dentro de uma região que será amplificada por um par de *primers* específicos para o gene alvo. Essas sondas possuem um fluoróforo na extremidade 5' e um *quencher* na extremidade 3' e ao serem clivadas pela ação da Taq polimerase na extensão da fita a partir do *primer*, o fluoróforo é liberado emitindo a fluorescência que será detectada pelo equipamento. Já nas reações feitas com *Sybr* a fluorescência é emitida através da ligação do fluoróforo nas fitas duplas de DNA geradas pela PCR e não especificamente ao gene alvo.

Todas as amostras foram diluídas a 10ng/μL para um volume final de 50μL. Os *primers* utilizados para a amplificação dos genes estão descritos na tabela 2. Para cada amostra foi utilizado 5μL mix BHQp, 0,5μL de cada *primer* de *bla_{KPC}* (ambos a 10μM), 0,5μL de cada *primer* de 16S rRNA (ambos a 10μM), 0,25μL de cada sonda (ambas a 10μM), 1μL de DNA (10ng) e água livre de nuclease para um volume final de 12μL. As condições de qPCR foram 95°C por 3 minutos (passo de ativação da enzima) e 40 ciclos de 95°C por 3 minutos (z) e 60°C por 30 segundos (anelamento e extensão). Os *primers* utilizados aqui são os mesmos preconizados pelo CDC para a detecção de *bla_{KPC}* e 16S rRNA em amostras clínicas (CDC, 2011). Eles amplificam regiões conservadas dos genes, não sendo possível diferenciar o tipo de variante de *bla_{KPC}*.

Tabela 2. Primers utilizados para a qPCR

Primer/Sonda	Gene	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
<i>bla</i> _{KPC} FW	<i>bla</i> _{KPC}	GGCCGCCGTGCAATAC	61
<i>bla</i> _{KPC} Rv	<i>bla</i> _{KPC}	GCCGCCCAACTCCTTCA	
Sonda <i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{KPC}	FAM -TG ATA ACG CCG CCG CCA ATT TGT	
16S rRNA Fw	16S rRNA	TGGAGCATGTGGTTTAATTCTGA	159
16S rRNA Rv	16S rRNA	TGCGGGACTTAACCCAACA	
Sonda 16S	16S rRNA	CY5 -CA CGA GCT GAC GAC AR*C CAT GCA	

As sondas utilizadas em cada sonda estão destacadas em negrito. pb: pares de base; Fw: Forward; Rv: Reverse; rRNA: RNA ribossômico.

Em cada reação foi incluído um controle positivo de *Klebsiella pneumoniae* contendo *bla*_{KPC} previamente sequenciado: Kp378.⁽¹⁰⁸⁾ Este controle positivo foi caracterizado quanto ao número de cópias do gene *bla*_{KPC} e 16S rRNA conforme descrito previamente.⁽²³⁹⁾ O número de cópias de *bla*_{KPC} e 16S rRNA foi determinado pela razão entre a cobertura do *contig* contendo *bla*_{KPC} e 16S rRNA e a cobertura média do genoma central (ponderada pelo comprimento do *contig*). A cobertura média do genoma central foi calculada como a média ponderada de todos os *contigs* do genoma central: [média de cobertura do genoma central = (comprimento do *contig*₁ x cobertura do *contig*₁ + comprimento do *contig*₂ x cobertura do *contig*₂ + ... + comprimento do *contig*_n x cobertura do *contig*_n) / soma (comprimento do *contig*₁, comprimento do *contig*₂, ... comprimento do *contig*_n)].

A quantidade relativa de *bla*_{KPC} tanto nas amostras quanto no controle positivo foi determinada pela diferença entre número de cópias de *bla*_{KPC} em relação número de cópias de 16S rRNA dado pelo limite de detecção de cada gene (CT – *cycle threshold*) ($\Delta Ct_{KPC} - \Delta Ct_{16S}$), obtendo-se assim um $\Delta Ct_{amostra}$ para cada amostra.⁽²⁷⁾ O Ct é definido como o número de ciclos necessários para o sinal fluorescente ultrapassar o *background* (limite de ruído do equipamento), sendo inversamente proporcional à quantidade de alvo presente na amostra, ou seja, quanto mais baixo o nível de Ct, maior a quantidade do gene alvo na amostra.

O ΔCt de cada amostra foi comparado ao ΔCt do controle positivo através do método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, o qual é um método utilizado para a quantificação relativa do gene de interesse em relação à uma amostra controle, onde o $\Delta\Delta Ct$ corresponde a

diferença entre o $\Delta C_{t\text{amostra}}$ e o $\Delta C_{t\text{Kp378}}$ ($\Delta C_{t\text{amostra}} - \Delta C_{t\text{Kp378}}$).

A carga intestinal relativa de cada paciente foi expressa pelo $\log(2^{-\Delta\Delta C_t})$. Valores de carga intestinal próximas a zero indicam que a amostra contém o número de cópias de *bla_{KPC}* semelhante ao da amostra controle, e valores maiores ou menores que zero indicam que os pacientes estavam colonizados com maiores ou menores cargas de ERC carreadoras de *bla_{KPC}*, respectivamente.⁽²⁷⁾ As barras de erro mostradas nos gráficos indicam desvios padrão ou erro padrão, conforme indicado.

2.16.4 Significância estatística

A significância estatística para os dados de carga intestinal foi avaliada pelo teste U Mann-Whitney não paramétrico usando o *software* Graphpad Prism 7.0 (Graph Pad Software Inc). A significância estatística para os fatores de risco foram avaliadas por ANOVA para variáveis contínuas (quantitativas) e teste exato de Fisher para variáveis categóricas (qualitativas) usando o *software* Graphpad Prism 9.0 (Graph Pad Software Inc).

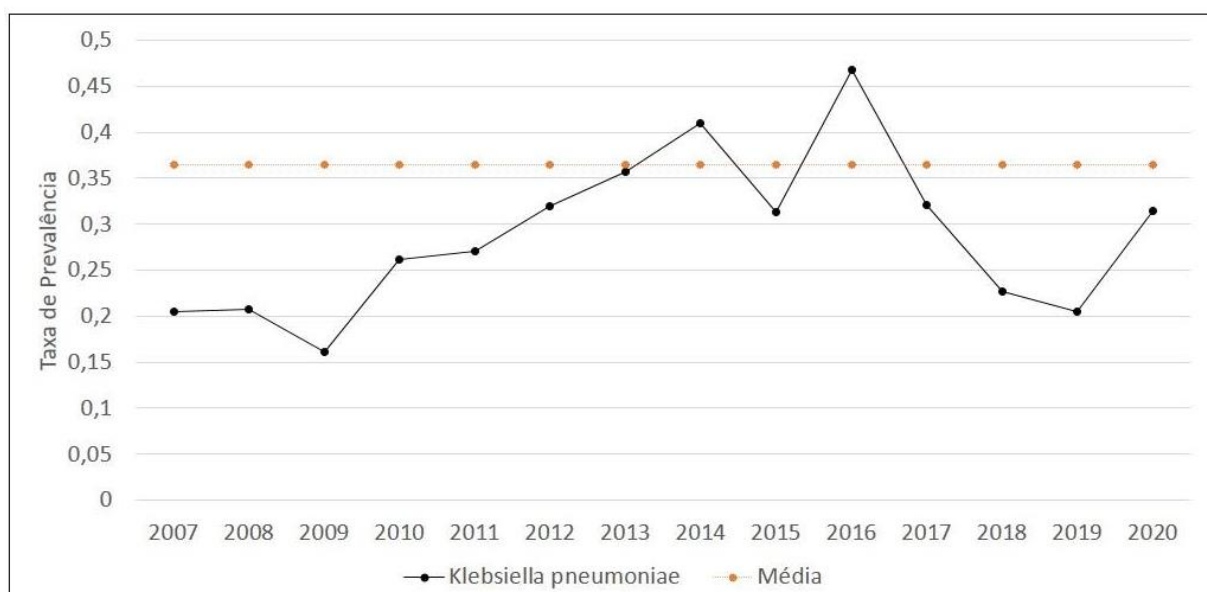
2.17 Aspectos éticos

Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HIAE (CAAE: 98373618.0.0000.0071).

3 RESULTADOS

3.1 Prevalência de *Klebsiella pneumoniae* no Hospital Israelita Albert Einstein ao longo do tempo

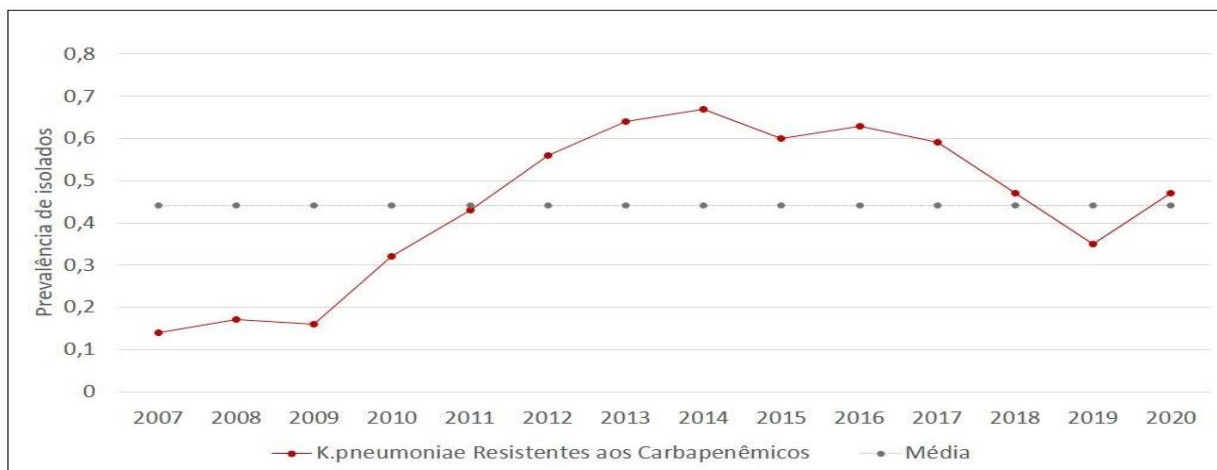
Entre 2007 e 2020, foram isoladas no HIAE 7920 *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes internados no período. A maior prevalência de *Klebsiella pneumoniae* no hospital foi observada a partir de 2013 onde as taxas ficaram acima da média institucional para o período avaliado, alcançando os maiores picos em 2014 e 2016 (Figura 9).



A taxa de prevalência foi calculada pela razão entre o número de isolados de *Klebsiella pneumoniae* por ano e o número de pacientes internados no Hospital Israelita Albert Einstein por ano entre janeiro de 2010 a dezembro de 2020.

Figura 9. Prevalência de *Klebsiella pneumoniae* no Hospital Israelita Albert Einstein

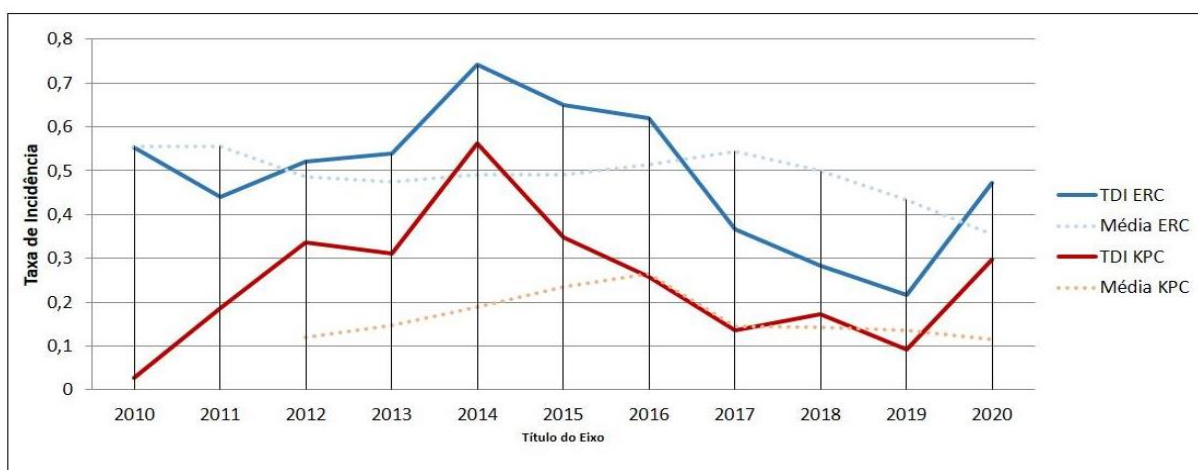
Com exceção de 2015, os períodos de maior prevalência de *Klebsiella pneumoniae* e KpRC foram os mesmos (Figuras 9 e 10). Também, nos períodos onde foi observada uma menor prevalência de *Klebsiella pneumoniae* (2015, 2017, 2018, 2019 e 2020) houve o predomínio de isolados resistentes aos carbapenêmicos (Figura 10). Isto demonstra que as *Klebsiella pneumoniae* encontradas nas amostras clínicas eram predominantemente KpRC.



Quantidade de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos isoladas por ano em amostras clínicas de pacientes internados no Hospital Israelita Albert Einstein entre janeiro de 2010 a dezembro de 2020. Valores foram expressos em porcentagem.

Figura 10. Prevalência de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos no Hospital Israelita Albert Einstein

Em paralelo a estes resultados, os dados disponibilizados pelo SCIH demonstram que nos anos onde houve maior incidência de ERC no HIAE (Figura 11) foram os mesmos onde houve maior prevalência de *Klebsiella pneumoniae* e KpRC segundo as nossas análises, com exceção de 2015. Esses dados sugerem que a *Klebsiella pneumoniae* é uma das enterobactérias que apresentam um papel importante no aumento das taxas de ERC hospital. Além disso, o aumento de ERC foi acompanhado do aumento de incidência de *bla*_{KPC}, demonstrando que este pode ser um dos principais mecanismos que contribuem para o aumento das taxas de resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias no HIAE (Figura 11).



TDI: taxa de incidência; ERC: enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. Dados de incidência de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos por ano entre janeiro de 2010 a dezembro de 2020 no Hospital Israelita Albert Einstein disponibilizados pelo Serviço de Controle de Infecção Hospitalar.

Figura 11. Incidência de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos ao longo do tempo

Os meses em que foram observadas as maiores incidências de ERC durante o período avaliado estão destacados na tabela 3.

Tabela 3. Períodos (em meses) de maior incidência de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos

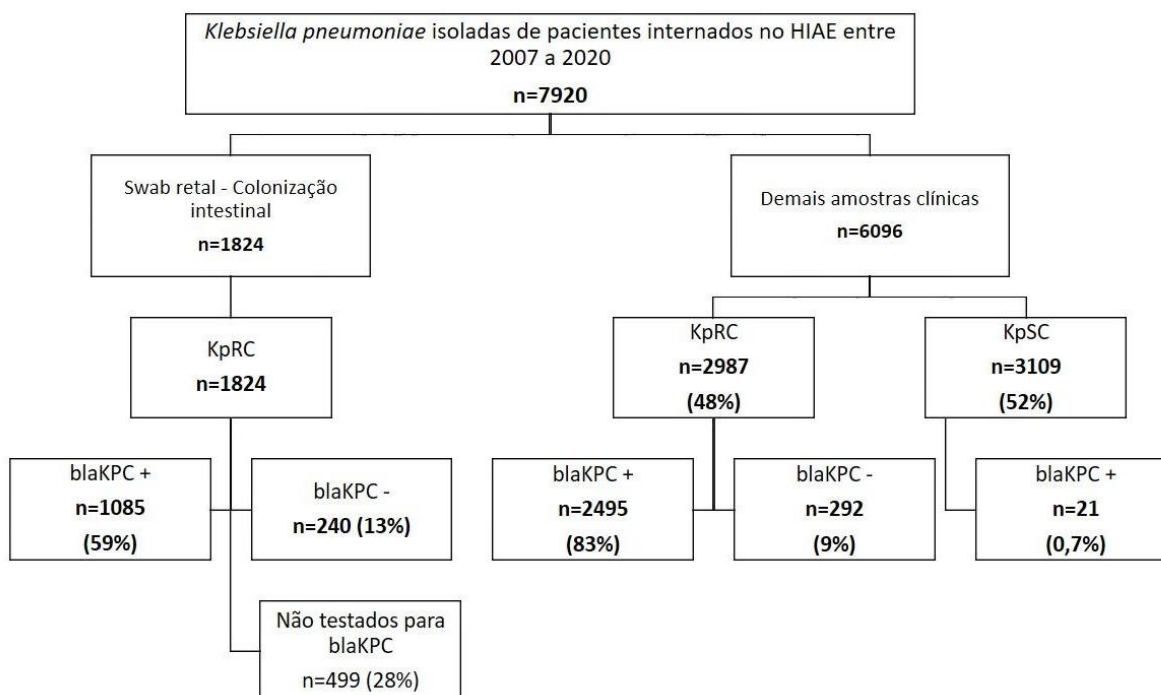
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2010								X				X
2011		X	X		X							
2012		X		X				X				
2013							X					X
2014							X	X	X	X		
2015				X			X	X				
2016		X						X				
2017		X										
2018					X							X
2019										X	X	
2020											X	X

"X" indica os meses onde houve maior incidência de ERC no HIAE em cada ano.

Embora as taxas institucionais de KpRC e ERC acima da média institucional tenham sido identificadas em 2013, a partir de 2010 já foi observado um aumento constante de KpRC e ERC no HIAE. Este fato pode estar associado à entrada de *bla*_{KPC} no hospital, encontrado em *Klebsiella pneumoniae* isolada em 2010.

3.2 Prevalência de *Klebsiella pneumoniae* em diferentes tipos de amostras clínicas

Dos 7920 isolados de *Klebsiella pneumoniae*, 1824 foram provenientes de amostras de colonização intestinal coletadas por swab retal para a cultura de vigilância e 6096 foram isoladas em demais amostras clínicas (Figura 12).



HIAE: Hospital Israelita Albert Einstein. KpRC: *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos. KpSC: *Klebsiella pneumoniae* sensível aos carbapenêmicos. Quantidade absoluta de *Klebsiella pneumoniae* nas amostras de colonização intestinal e outras espécimes clínicas, dentre elas sangue, lavado brônquico, secreção traqueal, urina, abscesso abdominal e líquido ascítico. Quantidade absoluta de isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes e suscetíveis aos carbapenêmicos e carreadores de *bla*_{KPC} nas amostras de colonização e outras espécimes clínicas.

Figura 12. Prevalência de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e carreadoras de *bla*_{KPC} nas amostras de colonização intestinal e demais amostras clínicas de pacientes internados no Hospital Israelita Albert Einstein

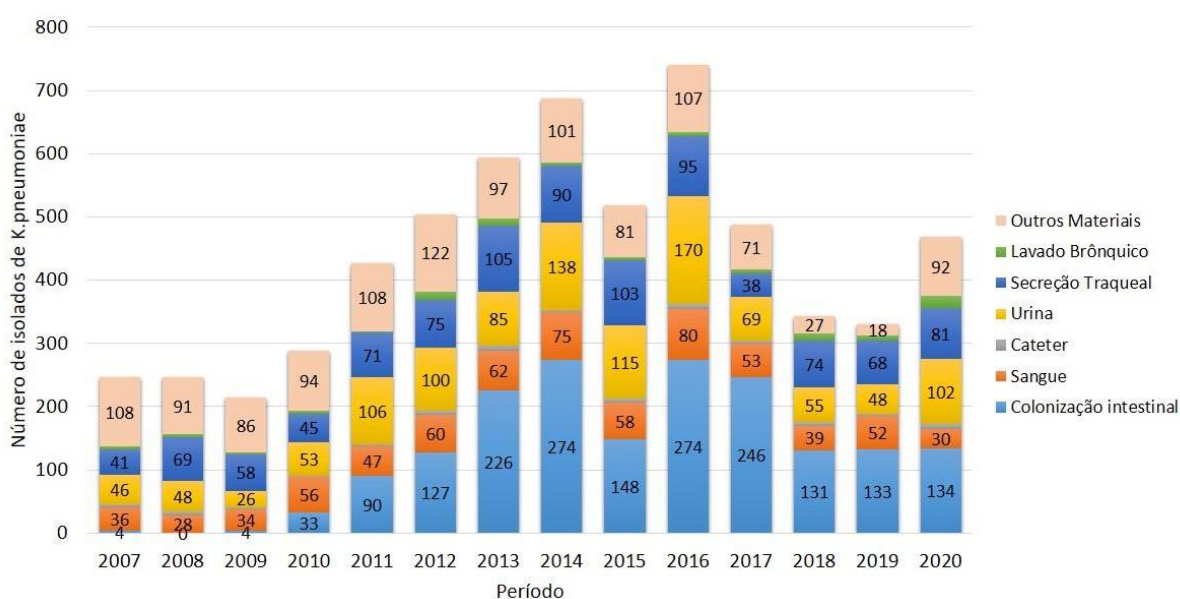
Todos os isolados provenientes das culturas de vigilância foram resistentes aos carbapenêmicos (Figura 12). Destes, 1085 carreavam *bla*_{KPC}, 240 não carreavam *bla*_{KPC} e 499 não foram testados para o gene, pois eram isolados de pacientes com histórico positivo para *bla*_{KPC} em análises anteriores e por isso não foram testados novamente dentro de 6 meses. Assim, dos 1824 isolados, 1325 foram provenientes de pacientes diferentes.

Nos isolados obtidos de outros sítios, 2987 foram resistentes aos carbapenêmicos dos quais 2495 carreavam *bla*_{KPC}, e 3109 foram suscetíveis. Apesar de

suscetíveis aos carbapenêmicos, os isolados que apresentaram concentrações inibitórias mínimas próximas ao limítrofe de resistência foram testados para a presença do gene *bla_{KPC}*. Neste caso, 21 (0,7%) isolados suscetíveis aos carbapenêmicos carregavam *bla_{KPC}*.

Embora a resistência a carbapenêmicos seja resultado de um conjunto de mecanismos de resistência, como a alterações nas porinas *ompK35*, *ompK36* e diferentes carbapenemases, dentre elas *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA}*,^(77,240,241) neste caso a maioria das KpRC carregavam *bla_{KPC}*, indicando a carbapenemase KPC como o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em *Klebsiella pneumoniae* no HIAE. Por isso, devido a importância de *Klebsiella pneumoniae* e KPC no país e também neste hospital, é que nós focamos o nosso estudo para esta enterobactéria e para este mecanismo de resistência em específico.

Entre 2007 e 2020, o número de *Klebsiella pneumoniae* isoladas por ano nas amostras de colonização variou entre 0 a 274 e nas demais amostras avaliadas em conjunto variou entre 198 a 467 (Figura 13).



A colonização intestinal foi um dos principais sítios de isolamento de *Klebsiella pneumoniae* no Hospital Israelita Albert Einstein em todo o período avaliado em comparação aos outros sítios avaliados isoladamente. *Klebsiella pneumoniae* amostras de colonização variou entre 0 a 274 e nas demais amostras avaliadas em conjunto variou entre 198 a 467 anualmente.

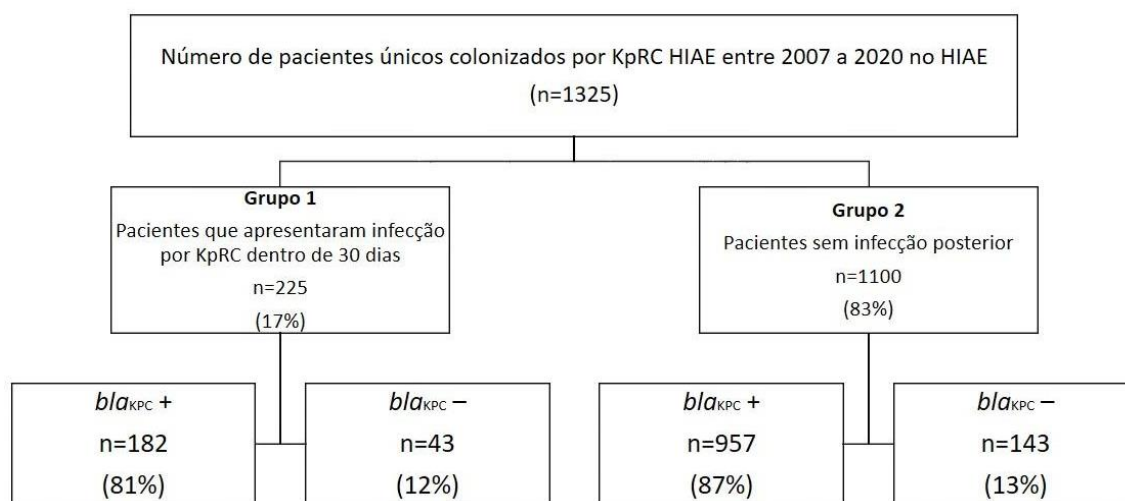
Figura 13. Prevalência de *Klebsiella pneumoniae* em diferentes espécimes clínicas

Nos períodos de maior prevalência de KpRC (2014 a 2017), mais de 40% de *Klebsiella pneumoniae* foram provenientes de colonização intestinal, podendo

chegar a mais de 50% em determinados períodos (2017). Estes resultados indicam que a colonização intestinal é um importante reservatório de KpRC, o que pode contribuir para a persistência dessa bactéria no ambiente hospitalar, principalmente por ser silenciosa em portadores assintomáticos. Neste sentido, destaca-se a importância das medidas de vigilância em identificar e isolar os carreadores, visando o controle da disseminação desse patógeno.

3.3 Prevalência de pacientes com infecções por *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos subsequentes à colonização intestinal

Para avaliar o papel da colonização intestinal nas infecções provocadas por KpRC, primeiramente foi estimada a quantidade de pacientes internados no HIAE entre 2007 a 2020 com infecções por KpRC dentro de 30 dias após a colonização intestinal por KpRC. Os pacientes foram divididos em dois grupos: pacientes colonizados por KpRC com infecção posterior (Grupo 1) e pacientes colonizados por KpRC sem infecção posterior (Grupo 2) (Figura 14).



KpRC: *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos. HIAE: Hospital Israelita Albert Einstein. Número de pacientes com e sem infecções subsequentes a colonização por *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e carreadoras de bla_{KPC}.

Figura 14. Prevalência de pacientes colonizados por *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos com infecções subsequentes a colonização

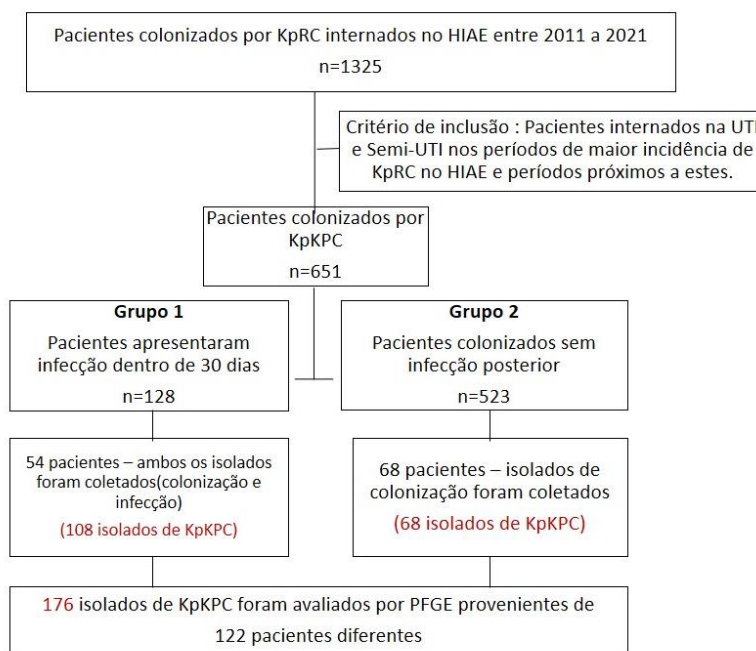
No período do estudo, foi identificado que dos pacientes colonizados por KpRC, 17% desenvolveram uma infecção subsequentes a colonização, e a maioria

foram causadas por isolados carreadores de *bla_{KPC}* (81%). E dos pacientes colonizados que não desenvolveram a infecção (83%), a maioria também estavam colonizados por isolados carreadores de *bla_{KPC}* (87%) (Figura 14). Embora a quantidade de pacientes com infecções subsequentes a colonização por KpRC tenha sido menor em relação ao grupo 2, proporcionalmente, os isolados carreando ou não *bla_{KPC}* foram similares em ambos os grupos, 81 e 87%, respectivamente.

Estes dados sugerem que, embora *bla_{KPC}* seja o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em *Klebsiella pneumoniae* no HIAE, é um mecanismo que aparentemente não está diretamente envolvido com o progresso para a infecção já que a proporção de *bla_{KPC}* foi similar nos grupos que desenvolveram ou não a infecção.

3.4 Caracterização da população de *Klebsiella pneumoniae* endêmica e esporádica do Hospital Israelita Albert Einstein por Eletroforese em gel de campo pulsado e a relação com as infecções subsequentes à colonização e com o aumento das taxas de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos

Dos 1325 pacientes colonizados por KpRC no HIAE, 651 estavam internados na UTI e Semi-UTI do HIAE entre 2011 e 2021 (Figura 15). Destes, 128 apresentaram infecção (Grupo 1) e 523 não apresentaram infecção posterior à colonização por KpKPC dentro de 30 dias (Grupo 2). Dos 128 pacientes do grupo 1, 54 atenderam aos critérios de inclusão descritos em métodos e ambos os isolados de colonização e infecção foram selecionados (n=108). Já do grupo 2, 68 isolados de diferentes pacientes foram selecionados para a análise por PFGE. No total, 176 KpKPC provenientes de 122 pacientes diferentes foram avaliados (Apêndice 1).



KpRC: *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos; HIAE: Hospital Israelita Albert Einstein; UTI: unidade de terapia intensiva; semi-UTI: unidade de terapia semi intensiva; KpKPC: *Klebsiella pneumoniae* carreadoras de carbapenemase. Cento e setenta e seis *Klebsiella pneumoniae* carreadoras de *bla_{KPC}* (KpKPC) de 122 pacientes internados na unidade de terapia intensiva e semi-intensiva do HIAE entre 2011 a 2021 foram selecionadas; 108 correspondem a isolados de KpKPC de colonização e infecção de 54 pacientes diferentes; 68 correspondem a isolados de colonização de 68 pacientes diferentes que não apresentaram infecções subsequentes.

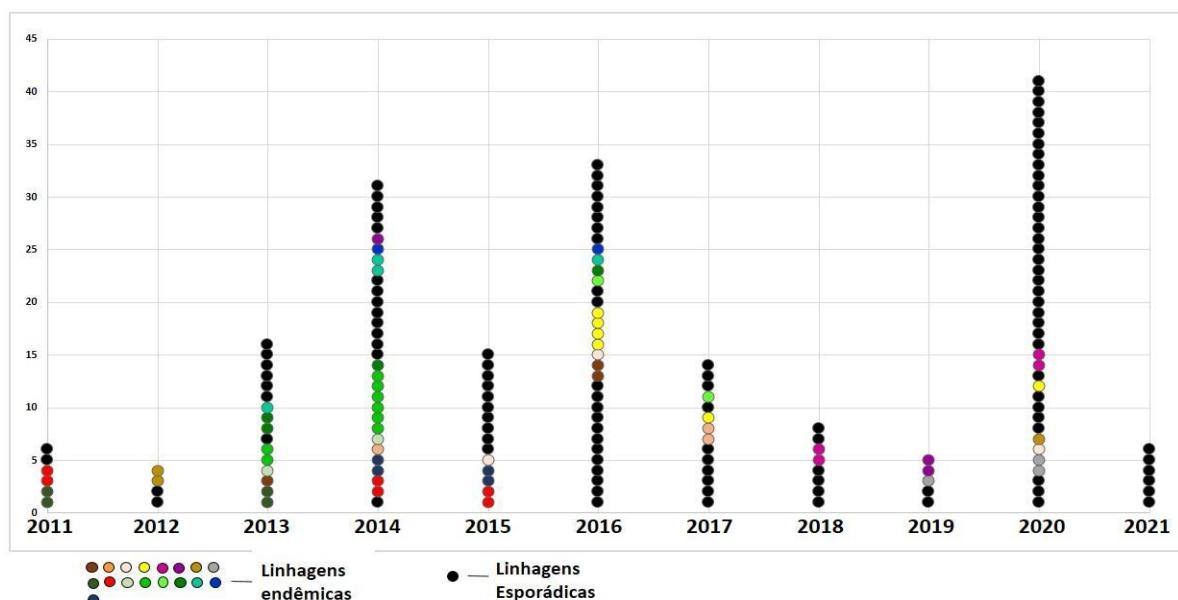
Figura 15. Isolados de *Klebsiella pneumoniae* selecionados para a análise por eletrofose em gel de campo pulsado

Segundo o perfil de bandas gerados pelo PFGE, os isolados foram agrupados em 89 filogrupos diferentes, sendo que cada filogrupo compreende isolados com um perfil de banda igual ou maior a 90% de similaridade (Apêndice 1).

Para a caracterização da população de KpKPC, estes isolados foram, portanto classificados em duas categorias: endêmicos e esporádicos. Os isolados endêmicos foram aqueles que apareceram em mais de um período ao longo do tempo em pacientes diferentes (Figura 16). Enquanto que os isolados esporádicos foram aqueles que apareceram em um ou mais pacientes internados no mesmo período e não voltaram a ser isolados em anos posteriores, ou seja, foram restritos a um período específico (Figura 16).

Dos 176 isolados de KpKPC avaliados, 65 foram considerados endêmicos e 111 esporádicos. Os 65 isolados de KpKPC foram agrupados em 18

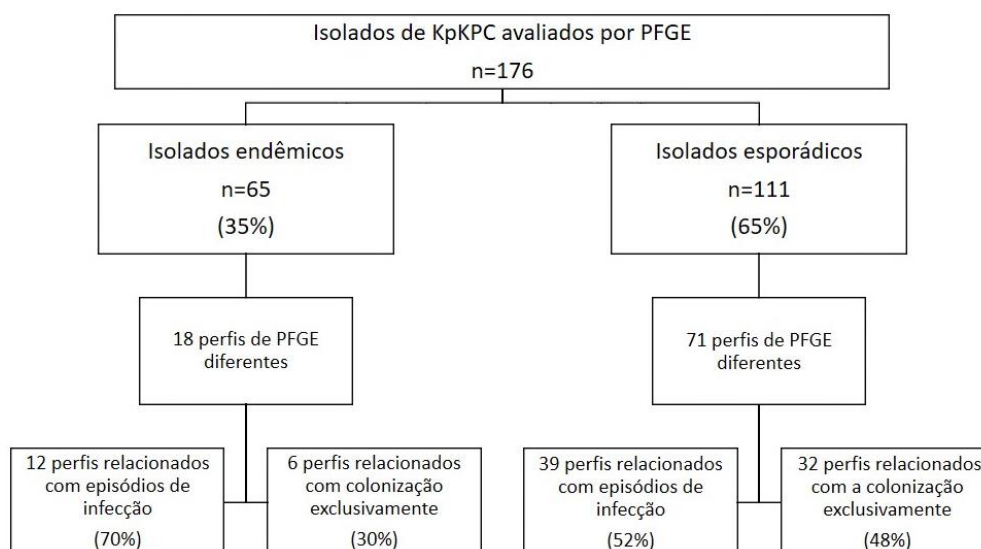
linhagens endêmicas circulantes no hospital ao longo dos anos (Figura 16), e os 111 isolados esporádicos foram agrupados em 71 linhagens diferentes (Figura 17).



Círculos coloridos: os isolados endêmicos, que apareceram em mais de um período ao longo do tempo (Ex. a KpKPC representada em círculos vermelho que foi isolada em diferentes pacientes internados em 2011, 2014 e 2015 e a KpKPC representada em amarelo foi isolada em 2016, 2017 e 2020). Círculos pretos: isolados esporádicos, aquelas KpKPC restritas a um período, ou seja, que apareceram em um ou mais pacientes internados no mesmo período e não voltaram a ser isolados em anos posteriores.

Figura 16. Distribuição temporal dos 176 isolados endêmicos e esporádicos de *Klebsiella pneumoniae* carreadora de *bla*_{KPC} de acordo com o perfil de bandas

Das 18 linhagens endêmicas, 12 estão relacionadas com infecções (70%), incluindo sangue, abscesso abdominal, líquido ascítico e lavado brônquico, e 6 estão relacionados exclusivamente com a colonização (Figura 17). Nos isolados esporádicos, 52% (39/71) foram identificados nos pacientes com infecção posterior (Figura 17).

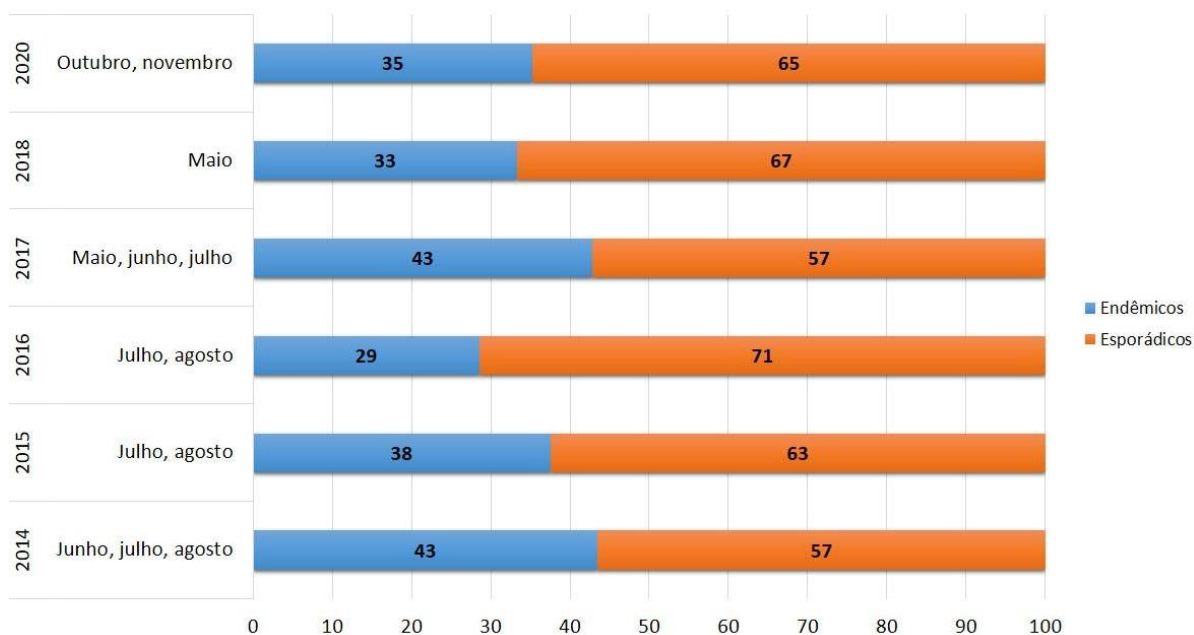


KpKPC: *Klebsiella pneumoniae* carreadoras de carbapenemase; PFGE: eletroforese em gel de campo pulsado (*pulsed field gel electrophoresis*).

As 18 linhagens endêmicas circulantes compreendem 65 *Klebsiella pneumoniae* isoladas de diferentes pacientes internados em diferentes anos; 12 linhagens estão relacionadas com episódios de infecção e 6 estão relacionadas com a colonização exclusivamente. As 71 linhagens esporádicas compreendem 111 *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes internados em um determinado período e não foram identificados nos anos seguintes.

Figura 17. Caracterização dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* em linhagens endêmicas e esporádicas circulantes no período avaliado

Em relação aos períodos de maior incidência de ERC no hospital, foi observado um predomínio de KpKPC esporádicos em relação aos endêmicos (Figura 18).



Os isolados esporádicos de *Klebsiella pneumoniae* foram encontrados em maior frequência em todos os períodos de maior incidência de ERC e prevalência de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos em relação aos isolados endêmicos de *Klebsiella pneumoniae*.

Figura 18. Frequência de *Klebsiella pneumoniae* endêmicas e esporádicas nos períodos de maior incidência de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e prevalência de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos

Esses dados demonstram que o aumento das taxas de resistência aos carbapenêmicos na instituição podem estar relacionados principalmente a presença de isolados esporádicos de KpKPC, enquanto que as infecções subsequentes a colonização podem ocorrer principalmente por linhagens endêmicas de KpKPC circulantes no HIAE.

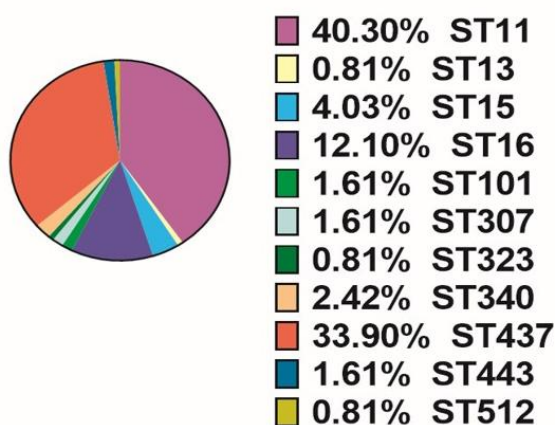
Também, através da análise por PFGE, foi possível identificar que a maioria dos pacientes que tiveram as infecções subsequentes à colonização apresentaram os mesmos isolados em ambos os episódios. Dos 54 pacientes, 85% (46/54) apresentaram os isolados com um padrão de bandas com similaridade $\geq 90\%$ em ambos os episódios. Esses dados demonstram que a colonização intestinal pode ser uma importante fonte primária das infecções.

3.5 Caracterização de *Klebsiella pneumoniae* circulantes no Hospital Israelita Albert Einstein baseado no tipo de sequência e a relação com infecções subsequentes à colonização

Dos 176 isolados provenientes de 122 pacientes diferentes que foram avaliados primeiramente por PFGE, pelo menos um isolado por paciente foi

sequeenciado, e dos pacientes que tiveram as infecções subsequentes à colonização (Grupo 1), somente o isolado de infecção foi sequeenciado (Apêndice 1). No total, 124 cepas de KpKPC foram sequeenciadas e caracterizados primeiramente quanto ao tipo de sequência (ST – *sequence type*).

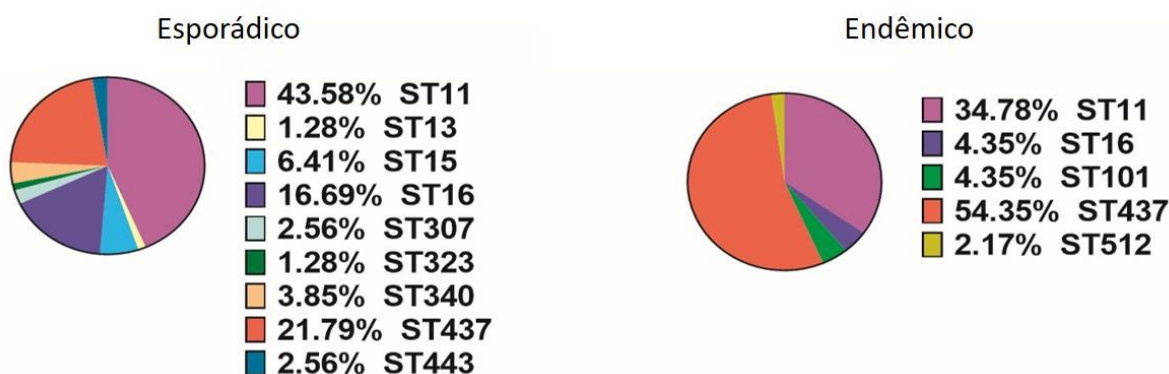
No geral, *Klebsiella pneumoniae* do ST11 foi mais prevalente no hospital (40,3%), seguido pelo ST437 (33,9%), ST16 (12,1%) e ST15 (4,03%). Os STs menos prevalentes (ST13, ST340, ST307, ST101, ST443, ST323 e ST512) em conjunto correspondem a 13% de KpKPC encontradas nas UTI e Semi-UTI e selecionadas para o estudo (Figura 19).



ST: tipo de sequência (*sequence type*) *Klebsiella pneumoniae* do ST 11 foi encontrado em maior frequência (40,3%) seguido pelo ST437 (33,9%), ST16 (12,1%) e ST15 (4,03%). Os demais STs juntos formam 13% da população de *Klebsiella pneumoniae* encontradas no HIAE.

Figura 19. Frequência do tipo de sequência de *Klebsiella pneumoniae* encontradas no hospital

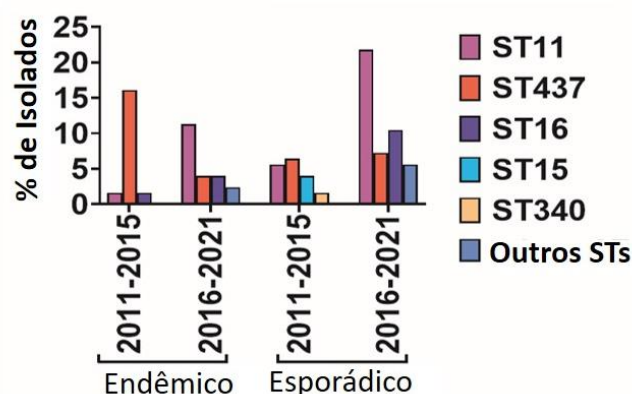
Dos 124 isolados sequeenciados, 46 corresponderam a cepas endêmicas (46/65) e 78 eram esporádicas (78/111). Os isolados esporádicos reuniram uma maior diversidade de ST em comparação aos isolados endêmicos (Figura 20). O ST11 foi predominante entre as esporádicas (43,58%) e o ST437 foi predominante entre as cepas endêmicas (54,35%) (Figura 20).



ST: tipo de sequência (*sequence type*). As linhagens esporádicas apresentam uma maior diversidade de *Klebsiella pneumoniae* sendo formadas por cepas do ST11, ST437, ST16, ST15, ST340, ST433, ST323, ST13, ST307. As linhagens endêmicas são formadas por *Klebsiella pneumoniae* dos ST11, ST437, ST512, ST101 e ST16.

Figura 20. Frequência dos tipos de sequência de *Klebsiella pneumoniae* encontrados nos isolados esporádicos e endêmicos

No entanto, vale a pena notar que em ambos os grupos (endêmicos e esporádicos) foi observada uma mudança na população KpKPC ao longo do tempo: entre 2011 e 2015, cepas do ST437 foram isoladas com maior frequência, enquanto entre 2016 e 2021, o ST11 foi o mais prevalente (Figura 21).

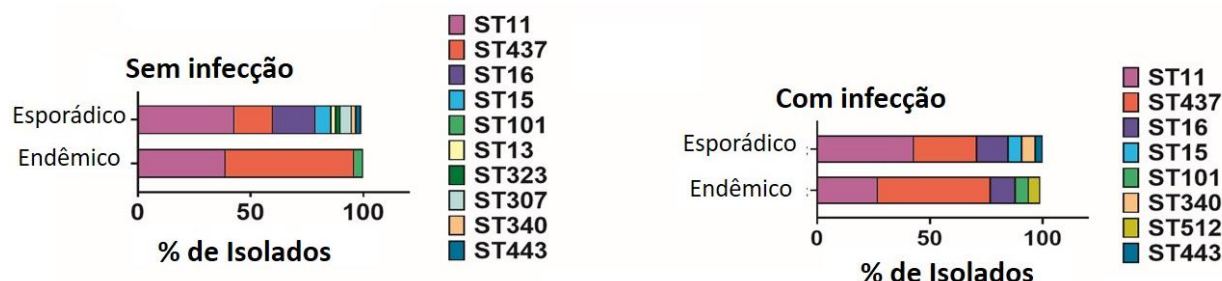


ST: tipo de sequência (*sequence type*). Em ambos os grupos (endêmico e esporádico), a ST437 foi a cepa mais prevalente entre 2011 e 2015, e a ST11 foi a mais prevalente entre 2016 e 2021.

Figura 21. Distribuição de isolados de *Klebsiella pneumoniae* carreadora de *bla_{KPC}* endêmicos e esporádicos em dois períodos diferentes

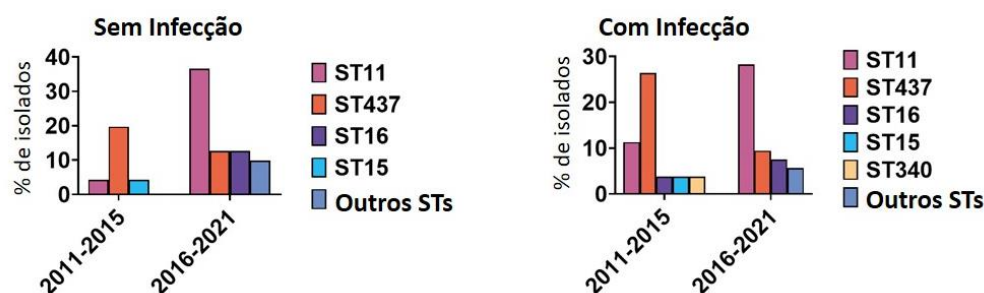
Não foi identificado o predomínio de um ST em específico nas amostras envolvidas com as infecções em comparação com os STs encontrados somente na colonização, tanto no grupo de cepas endêmicas quanto no grupo de cepas esporádicas (Figura 22). A maioria dos isolados envolvidos com as infecções pertenciam

aos STs mais prevalentes em cada período: ST437 em 2011-2015 e ST11 em 2016-2021 (Figura 23).



ST: tipo de sequência (*Sequence type*). A frequência de STs das linhagens endêmicas e esporádicas envolvidas ou não com infecções subsequentes foi similar em ambos os grupos de amostras.

Figura 22. Frequência dos tipos de sequência em linhagens endêmicas e esporádicas de *Klebsiella pneumoniae* nas amostras envolvidas ou não com infecções de pacientes colonizados por *Klebsiella pneumoniae* carreadora de *bla_{KPC}*



ST: tipo de sequência (*sequence type*). As infecções foram ocasionadas por cepas mais prevalentes em cada período: ST437 em 2011-2015 e ST11 em 2016-2021.

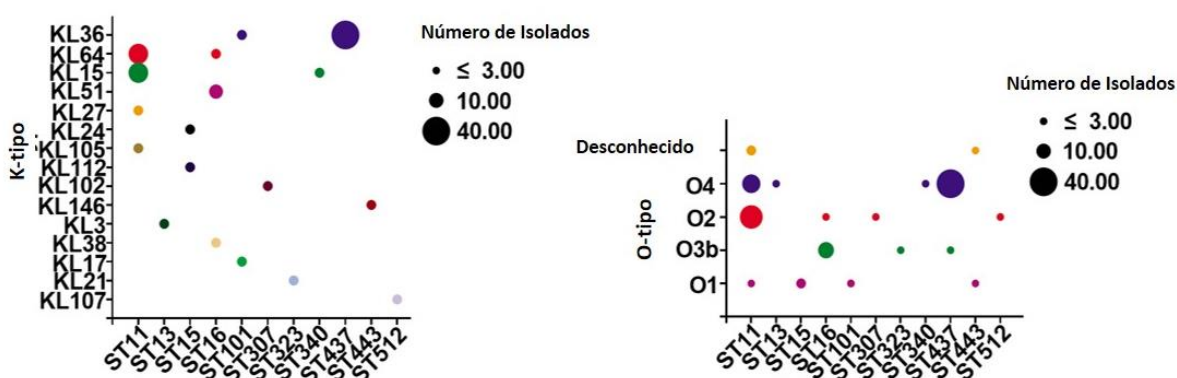
Figura 23. Frequência dos tipos de sequência em linhagens endêmicas e esporádicas de *Klebsiella pneumoniae* nas amostras envolvidas ou não com infecções de pacientes colonizados por *Klebsiella pneumoniae* carreadora de *bla_{KPC}* avaliada por períodos

Embora a maioria das linhagens endêmicas estejam envolvidas com as infecções subsequentes à colonização, estas não foram relacionadas a um único ST de *Klebsiella pneumoniae*, mas sim aos ST predominantes em cada período.

3.6 Determinantes genéticos de virulência presentes nas *Klebsiella pneumoniae* circulantes no Hospital Israelita Albert Einstein e a potencial relação com as infecções subsequentes

Os 124 isolados de KpKPC sequenciados foram avaliados para a

presença ou ausência de genes relacionados com a virulência em *Klebsiella pneumoniae*, e também quanto ao tipo capsular (K-loci) e antígeno-O (O-tipo). Foram identificados 15 grupos distintos de K-loci, sendo o mais recorrente KL36 correspondente ao ST437, seguido por KL64 e KL15 nas cepas ST11. Nos períodos onde foi observado o predomínio de ST437 (2011 - 2015), todos as cepas endêmicas e esporádicas deste ST apresentavam KL36. Enquanto que nos períodos onde foi observado o predomínio do ST11 (2016-2021), KL64 e KL15 foram os principais tipos capsulares encontrados nas cepas endêmicas e esporádicas deste ST. Os tipos capsulares KL1 e KL2, que são os tipos capsulares associados a cepas hipervirulentas, não foram encontrados nos nossos isolados.^(138,152,242,243) Também foram identificados quatro tipos diferentes de antígeno-O, dos quais o O4 foi predominante nas cepas ST437 e ST11, seguido por O2 e O3b nas cepas ST11 e ST16 respectivamente (Figura 24).

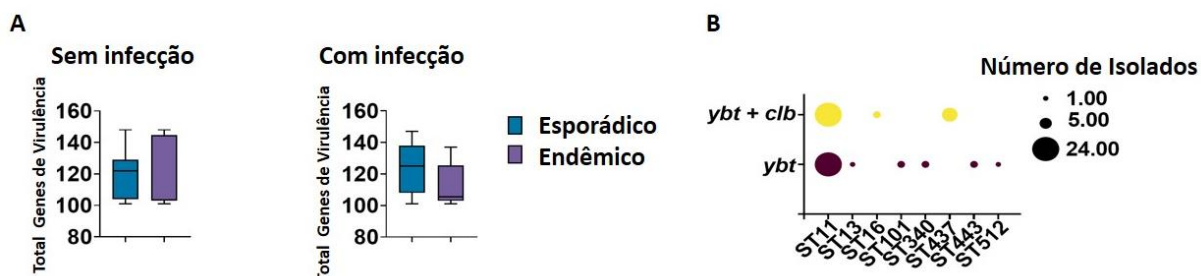


Os tipos capsulares frequentemente encontrados no isolados de KpKPC foram KL36, KL64, KL15 e KL51 principalmente nas cepas dos ST437, ST11, ST15 e ST16, respectivamente. Os antígenos-O encontrados foram O4, O2, O3b e O1, principalmente nas cepas dos ST437, ST11, ST16 e ST15, respectivamente.

Figura 24. Tipos capsulares (K-Tipo) e antígenos-O (O-tipo) dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* carreadora de *bla_{KPC}*

Em relação à quantidade de genes de virulência, não foi observada uma variação na quantidade desses genes entre os isolados endêmicos e esporádicos envolvidos ou não com infecções (Figura 25A). Todos os isolados apresentaram genes que codificam as fímbrias tipo 1 e 3, genes relacionados à síntese e regulação de CPS, LPS, adesinas, pili e o sideróforo ent. A principal diferença foi observada para os genes que codificam o sideróforo Ybt (*locus Ybt*) associados ou não ao *loci* que codifica a Clb (Figura 25B). Dos 124 isolados sequenciados, 32 carregavam o *locus Ybt*, 34 carregavam o *locus Ybt* e *clb* e 58 isolados não tinham nenhum desses genes. O *locus*

Ybt associado com *clb* foram encontrados nos isolados do ST11, ST437 e ST16. Já o *locus* Ybt sozinho foi encontrado nos isolados do ST11, ST13, ST101, ST340, ST443 e ST512 (Figura 26B).

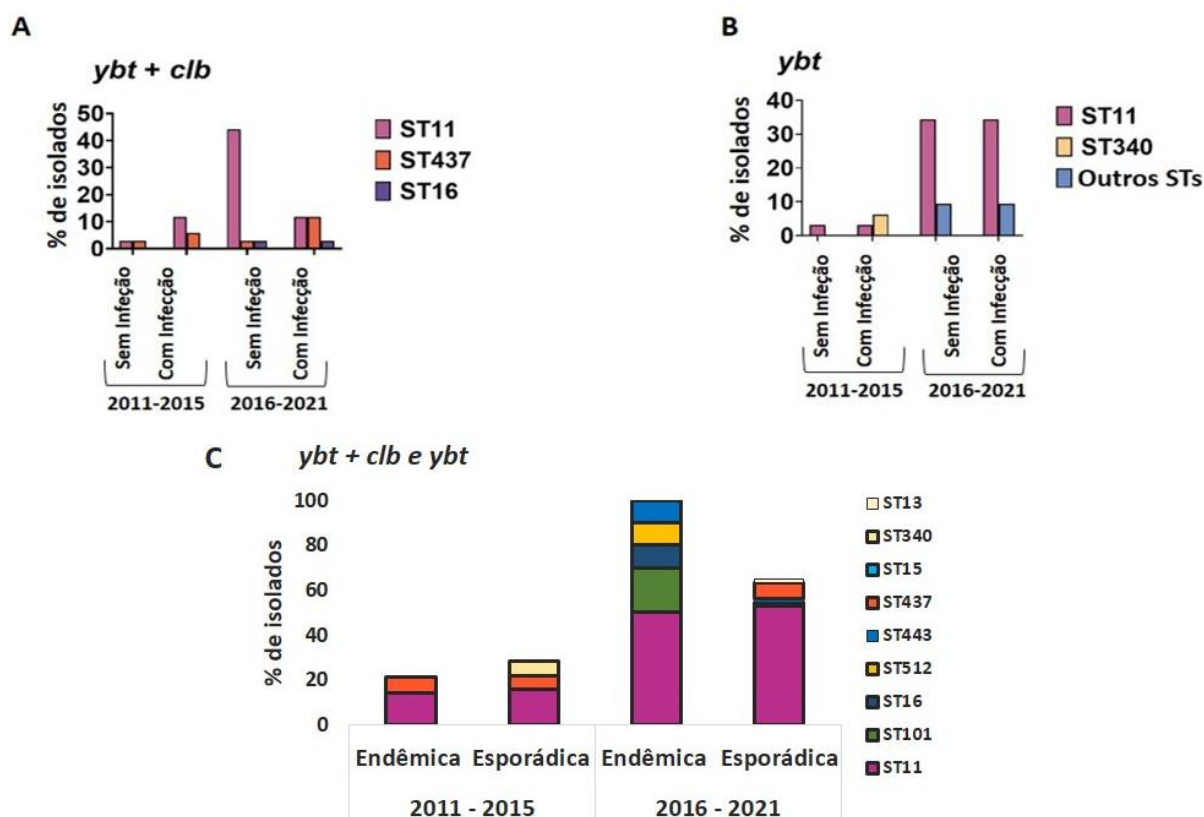


Ybt: yersiniobactin; Clb: colibactin; ST: tipo de sequência (*sequence type*).

Quantidade de genes de virulência presentes nos isolados endêmicos e esporádicos envolvidos ou não com os episódios de infecção (A). Presença do *locus* Ybt associados ou não com o gene que codifica Clb de acordo com o ST da cepa (B).

Figura 25. Genes de virulência presentes nos isolados de *Klebsiella pneumoniae* carreadora de *bla_{KPC}*

Tanto o *locus* Ybt sozinho ou associado á Clb foram encontrados recentemente no hospital, entre 2016 e 2021, e estavam principalmente associados a cepas ST11 nas linhagens endêmicas quanto esporádicas (Figura 26A, B e C). Entre 2011 a 2015, apenas 21% (3/14) e 28% (8/32) dos isolados endêmicos e esporádicos carregavam o *locus* Ybt sozinho ou associado á Clb, enquanto de 2016 a 2021, 100% (10/10) e 65% (44/68) dos isolados endêmicos e esporádicos carregavam o *locus* Ybt sozinho ou associado á Clb (Figura 26C). Demonstrando que o *locus* Ybt pode contribuir com a endemicidade das cepas isoladas recentemente no hospital.



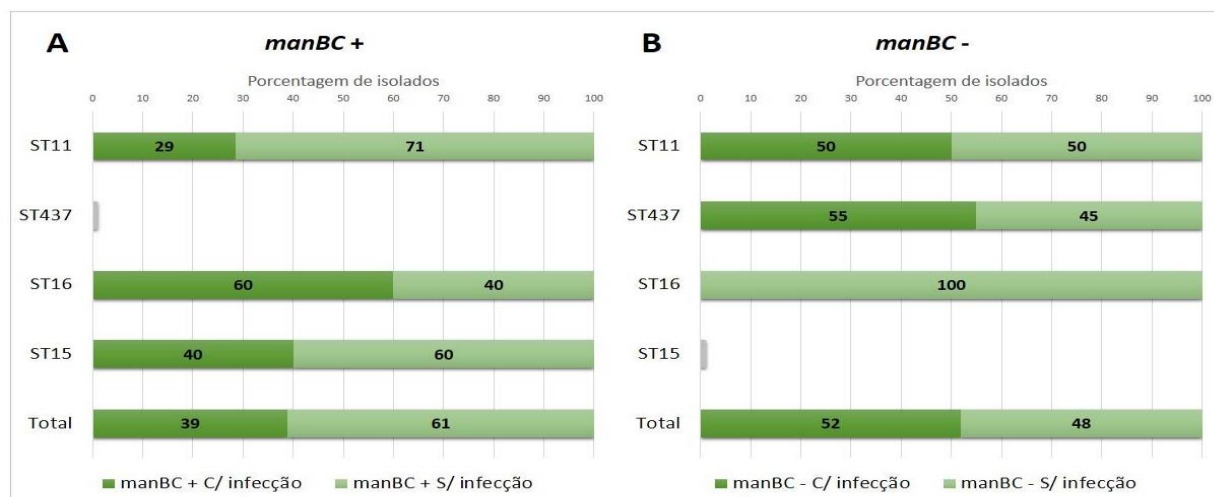
Ybt: yersiniobactin. Clb: colibactin. ST: tipo de sequência (*sequence type*). O *locus* Ybt associado ou não com *clb* foram encontrados principalmente no período mais recente, 2016-2021. A) Ybt associado a *clb* foi encontrado principalmente em cepas do ST11 que não estavam envolvidas com infecções. B) Ybt sozinho também foram encontrados em cepas do ST11 e sua prevalência foi similar nos isolados envolvidos ou não com infecções. C) Ybt com ou sem a *clb* foram encontrados principalmente nas cepas isoladas mais recentemente no hospital (2016-2021), e todas as cepas endêmicas carregam este mecanismo de virulência.

Figura 26. Presença do *locus* Ybt associado ou não com o gene que codifica colibactin de acordo com o tipo de sequência da cepa e classificadas por períodos

Surpreendentemente, os genes de virulência não foram encontrados predominantemente nos isolados envolvidos com a infecção, ao contrário do esperado o *locus* Ybt associado a *clb* foi encontrado em maior frequência em isolados presentes exclusivamente na colonização (Figura 26A).

Os genes *manB* e *manC* são reguladores envolvidos nos estágios iniciais da biossíntese da CPS bacteriana, e mutações que conduzem à perda de função destes genes contribuíram para o aparecimento de isolados com menor capacidade de estabelecer a colonização e foram menos eliminados nas fezes em comparação com a cepa selvagem.⁽¹⁵²⁾ Assim, estes dois genes foram relacionados com linhagens Hv de *Klebsiella pneumoniae* e que contribuem para fenótipo de “superdispersor” no hospedeiro, no qual há eliminação do patógeno nas fezes em quantidades muito superiores em relação a outros hospedeiros colonizados.⁽¹⁵²⁾

Neste estudo, nós observamos que poucos STs carregavam *manBC* (ST11, ST15, ST16 e ST443) e apenas 39% estavam envolvidos com infecções (Figura 27). No entanto, é importante ressaltar que *manBC* estavam presentes em quase todas as KpKPC do ST16 (10/11), e neste ST em específico, 60% das cepas estavam envolvidas em infecções (Figura 27). Vale ressaltar que *Klebsiella pneumoniae* ST16 é uma linhagem emergente associada a altas taxas de mortalidade (95%).⁽²⁰⁾



A) Dentre os isolados de *Klebsiella pneumoniae* que carregavam *manBC*, 39 e 61% foram isoladas tanto em amostras de infecção como de colonização, respectivamente; 29, 60, e 40% dos isolados dos ST11, ST16 e ST15 estavam envolvidos com infecções, e 71, 40 e 60% dos isolados dos ST11, ST16 e ST15 estavam envolvidos com a colonização exclusivamente. B) Dentre os isolados de *Klebsiella pneumoniae* que não carregavam *manBC*, aproximadamente metade foi isolada tanto em amostras de colonização quanto de infecção; com exceção do ST16, metade isolados dos demais STs estavam envolvidos com infecções.

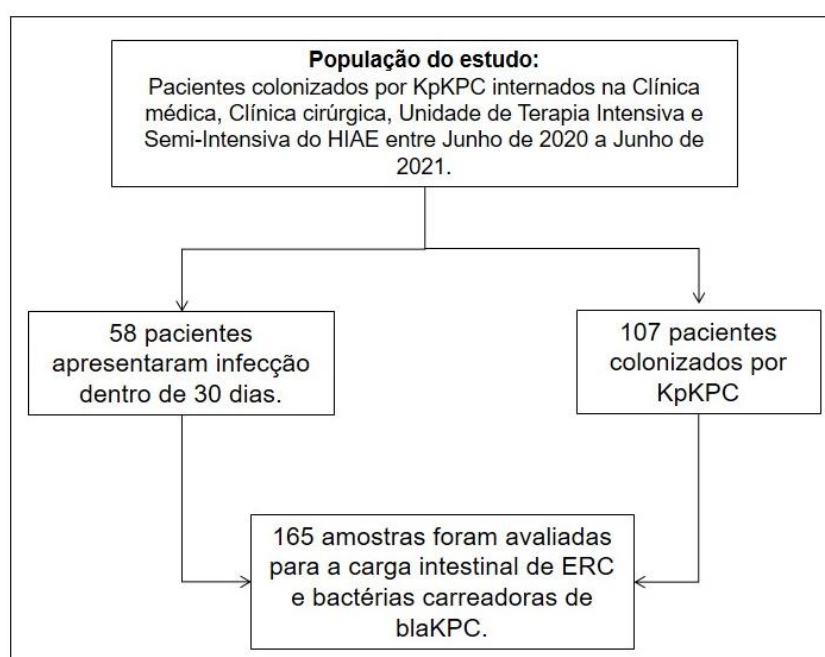
Figura 27. Frequência de isolados de *Klebsiella pneumoniae* carreadores e não carreadores de *manBC* isoladas em amostras de colonização e infecção

Embora tenham sido encontrados importantes mecanismos de virulência associados a colonização e infecção em *Klebsiella pneumoniae*, a maioria dos isolados carreadores desses mecanismos não estavam envolvidos com os episódios de infecção subsequentes à colonização. Em conjunto, esses resultados desmonstram que esses mecanismos, embora contribuam para o desenvolvimento das infecções, não explicam as infecções subsequentes a colonização por KpKPC, demonstrando a complexidade do processo de transição da colonização para infecção e indicam que outros fatores também podem estar associados com a transição de KpKPC da colonização intestinal para episódios de infecção, dentre os quais, a densidade da colonização intestinal por ERC.

3.7 Avaliação da carga intestinal relativa de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e bactérias carreadoras do gene *bla*_{KPC} e sua relação com as infecções subsequentes

A densidade da colonização por ERC vem sendo considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento de infecções.^(222,225) Assim, carga intestinal relativa de ERC e de *bla*_{KPC} de 140 pacientes internados no HIAE foram estimadas por métodos de quantificação microbiológica e molecular, respectivamente. Esses pacientes foram internados em clínica médica, clínica cirúrgica, semi-intensiva e UTI entre junho de 2020 e outubro de 2021, e foram acompanhados semanalmente por 30 dias após a identificação da colonização intestinal pelo KpKPC para identificação de infecções subsequentes.

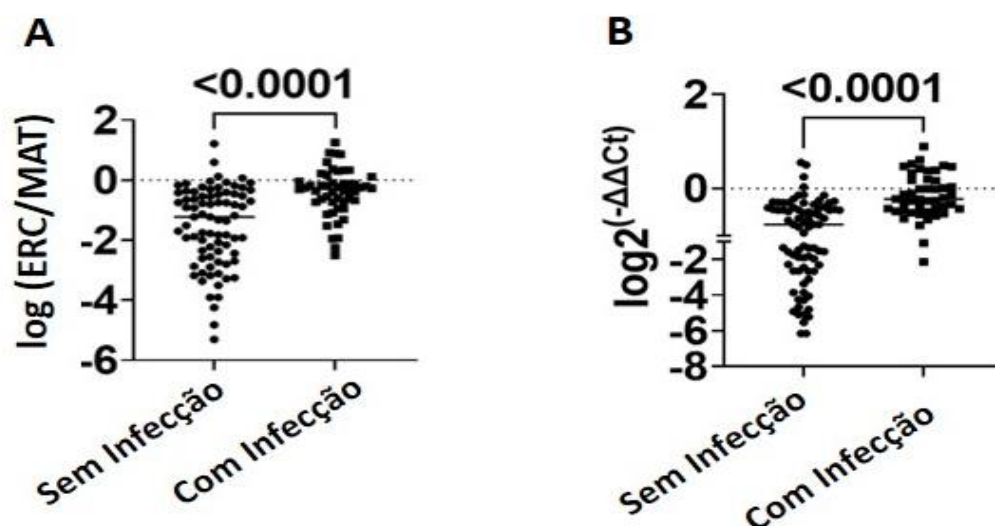
Dos 165 pacientes avaliados, 58 apresentaram infecção subsequente à colonização (grupo de infecção) em 30 dias, e 107 apresentaram apenas colonização intestinal por KpKPC (grupo de colonização) (Figura 28).



KpKPC: *Klebsiella pneumoniae* carreadora de *bla*_{KPC}; HIAE: Hospital Israelita Albert Einstein; ERC: enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. Dos 165 pacientes colonizados por *Klebsiella pneumoniae* carreadora de *bla*_{KPC} selecionados para a quantificação da carga intestinal de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e bactérias carreadoras de *bla*_{KPC}, 58 apresentaram infecção subsequente por KpKPC à colonização dentro de 30 dias e 107 apresentaram somente a colonização por KpKPC, sem infecção posterior.

Figura 28. Avaliação da carga intestinal de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e bactérias carreadoras de *bla*_{KPC} em pacientes internados no hospital

A carga intestinal relativa de ERC foi estimada primeiramente pelo método microbiológico a partir do *swab* retal coletado dos pacientes como parte do programa de vigilância. Neste método foi avaliada a quantidade de ERC em relação à microbiota total aeróbia e viável em ambos os grupos de pacientes. A carga relativa de ERC no grupo de paciente com infecção foi maior (mediana de -0,54, IC 95%: -0,77 a -0,30) do que no grupo de pacientes sem infecção (mediana de -1,49, 95% CI: -1,76 a -1,23) ($p < 0,0001$) (Figura 29A). Essas análises demonstram que os pacientes com infecções subsequentes apresentam maior carga intestinal de ERC em relação aos pacientes sem infecção.



ERC: enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos; MAT: microbiota total aeróbia. Valores de carga intestinal próximas a zero indicam que o paciente possui altas quantidades de ERC e backKPC na colonização intestinal, enquanto valores menores indicam graus mais baixos de colonização. A) Quantificação microbiológica da carga intestinal relativa de ERC. Pacientes com infecções subsequentes apresentaram maior carga intestinal de ERC em relação a pacientes sem infecção ($p < 0,0001$). B) Quantificação molecular da carga intestinal relativa de backKPC. Pacientes com infecções subsequentes apresentaram maior carga intestinal de backKPC em relação a pacientes sem infecção ($p < 0,0001$). MAT: microbiota total aeróbia; $\log_2(-\Delta\Delta Ct) = \Delta Ct_{amostra} - \Delta Ct_{Kp378} (\Delta\Delta Ct)$.

Figura 29. Quantificação da carga intestinal relativa de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e bactérias carreadoras de *bla*_{KPC} por método microbiológico e molecular, respectivamente

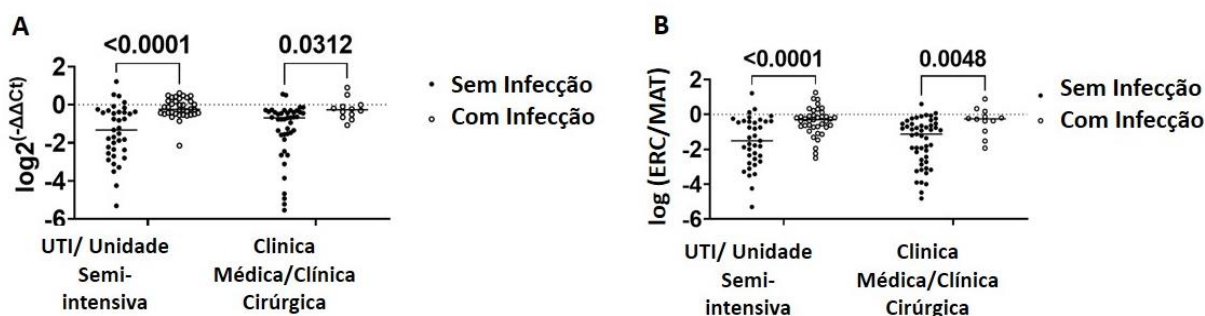
Em paralelo, a carga intestinal relativa de backKPC foi avaliada para o mesmo grupo de pacientes. A quantidade de backKPC foi avaliada em relação a microbiota total (aeróbia e anaeróbia) através do método de qPCR. Da mesma forma, o grupo de pacientes com infecção apresentou maior carga relativa de backKPC (mediana de -0,28, IC 95%: -0,51 a -0,06), em comparação aos pacientes sem infecção (mediana de -1,36, IC 95%: -1,69 a -1,02) ($p < 0,0001$) (Figura 29B).

Além da densidade da colonização intestinal, foram avaliados fatores de risco relacionados aos pacientes que podem contribuir para o desenvolvimento das infecções (Tabela 4). Foram analisados os dados de 58 pacientes colonizados que desenvolveram infecção e 107 pacientes que não desenvolveram a infecção subsequente. Dos 58 pacientes que desenvolveram a infecção subsequentes a colonização, 76% estavam internados na UTI ou unidade semi-intensiva *versus* 24% dos pacientes internados na clínica médica e clínica cirúrgica. Admissão em unidade semi-intensiva e UTI foram considerados fatores de risco para o desenvolvimento de infecções em nossa coorte (OR 2.79, 95% CI 1.375 to 5.687, $p=0,005$) (Tabela 4). No entanto, tanto os pacientes de UTI ou unidades de terapia semi-intensiva quanto aqueles internados na clínica médica e cirúrgica apresentaram cargas intestinais maiores de CRE e backKPC quando pertenceram ao grupo de infecção quando comparados ao grupo sem infecção ($p<0,05$) (Figura 30).

Tabela 4. Fatores de risco para infecção avaliados neste estudo

Fator de risco	Colonização (n=107)	Infecção (n=58)	Valor-p
Média de idade (anos)	65 (17,4)	64,9 (17,8)	0,74
Gênero			
Feminino	38 (34,9)	22 (37,9)	>0,9999
Masculino	69 (65,1)	36 (62,1)	
Diabetes mellitus	14 (13,9)	4 (7,1)	0,297
Doença renal crônica	11 (10,9)	6 (10,7)	1,000
Transplante de órgão sólido	4 (4)	4 (7)	0,457
Doença onco-hematológica	2 (3,6)	2 (2)	0,617
Quimioterapia	2 (2)	1 (1,8)	1,000
Uso de carbapenêmicos	51 (50,5)	28 (51,9)	1,000
Uso de quinolonas	10 (9,9)	2 (3,7)	0,218
Uso de cefalosporinas	35 (34,7)	21 (38,9)	0,604
Hospitalização dentro dos últimos 2 meses	53 (52,5)	34 (61,8)	0,312
Cateter venoso central	47 (46,5)	27 (48,2)	0,869
Doença gastrointestinal prévia	12 (11,9)	4 (7,1)	0,419
Cirurgia abdominal	8 (7,9)	6 (10,7)	0,519
UTI/ semi-UTI (<i>versus</i> Clínica Médica/Clínica Cirúrgica)	42 (72,4)	51 (48,1)	<u>0,003</u>
Dispositivos de ventilação mecânica	51 (51)	31 (55,4)	0,620

DP: desvio padrão; UTI: unidade de terapia intensiva; semi-UTI: unidade de terapia semi intensiva; KpKPC: *Klebsiella pneumoniae* carreadora de *bla*_{KPC}. IC 95%: intervalo de confiança. OR: *odds ratio*.

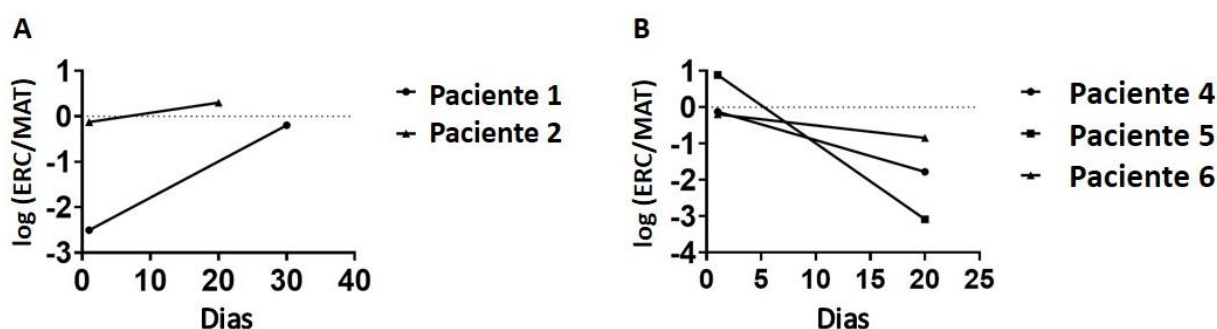


UTI: unidade de terapia intensiva, semi-UTI: unidade de terapia semi-intensiva; ERC: enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos; MAT: microbiota total aeróbia. A) Carga intestinal relativa de backKPC. B) Carga intestinal relativa de ERC. Os valores-p foram calculados usando o teste Two Way Anova.

Figura 30. Avaliação das cargas intestinais relativas em pacientes colonizados por *Klebsiella pneumoniae* carreadora de *bla_{KPC}* que desenvolveram ou não infecções subsequentes considerando admissão em Unidade de Terapia Intensiva, semi-intensiva ou clínica médica e clínica cirúrgica

Para 5 pacientes, a carga relativa de ERC foi avaliada em dois momentos: dois pacientes que desenvolveram infecção 30 dias após a análise da primeira amostra de *swab* retal (colonização intestinal), e três pacientes já apresentavam infecção quando a primeira amostra de *swab* retal foi coletada e uma segunda amostra de *swab* foi coletada 20 dias depois.

A carga intestinal relativa de ERC aumentou para os dois primeiros pacientes até o episódio de infecção (Figura 31A). Enquanto para os demais pacientes que já apresentavam infecções e altas cargas relativas de ERC, estas diminuíram após o episódio de infecção (Figura 31B).



ERC: enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos; MAT: microbiota total aeróbia. A) Aumento da carga intestinal relativa de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos de dois pacientes que desenvolveram infecção dentro de 30 dias após a análise da primeira amostra de *swab* retal. B) Diminuição da carga intestinal relativa de três pacientes após o desenvolvimento das infecções subsequentes a colonização intestinal.

Figura 31. Avaliação da carga relativa de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos antes e após o desenvolvimento das infecções

Em conjunto, esses dados sugerem que os pacientes que apresentam infecção também apresentam um aumento gradativo da carga intestinal ERC e backKPC, a qual é sustentada em alta densidade até o desenvolvimento da infecção, sendo maior do que em pacientes também colonizados que não desenvolveram a infecção.

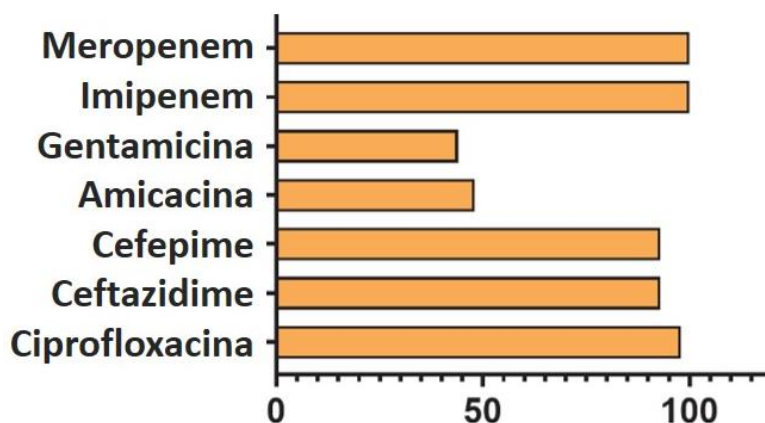
3.8 Perfil de resistência a antibióticos, determinantes genéticos de resistência, variantes de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase encontradas no hospital e seus contextos genômicos em *Klebsiella pneumoniae*

O perfil de resistência aos antibióticos e os determinantes e variantes genéticas que contribuem para a resistência de *Klebsiella pneumoniae* estão descritas na subseção 3.8.1 e os contextos genômicos onde esses determinantes genéticos estão inseridos estão descritos na subseção 3.8.2.

3.8.1 Perfil de resistência a antibióticos e determinantes genéticos para a resistência a cefalosporinas, aminoglicosídeos e fluoroquinolona

Todos os isolados incluídos neste estudo (n=124) eram resistentes aos carbapenêmicos (Imipenem e Meropenem) (critério de inclusão). Os isolados de colonização são testados somente para esta classe de antimicrobianos, enquanto os isolados de infecção são testados também para Ceftazidima, Cefepima, Amicacina, Gentamicina, Ciprofloxacina. Assim, o perfil de resistência a Ceftazidima, Cefepima, Amicacina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Imipenem e Meropenem foi demonstrado para os 54 isolados provenientes de amostras de infecção (item 3.4) (Figura 31).

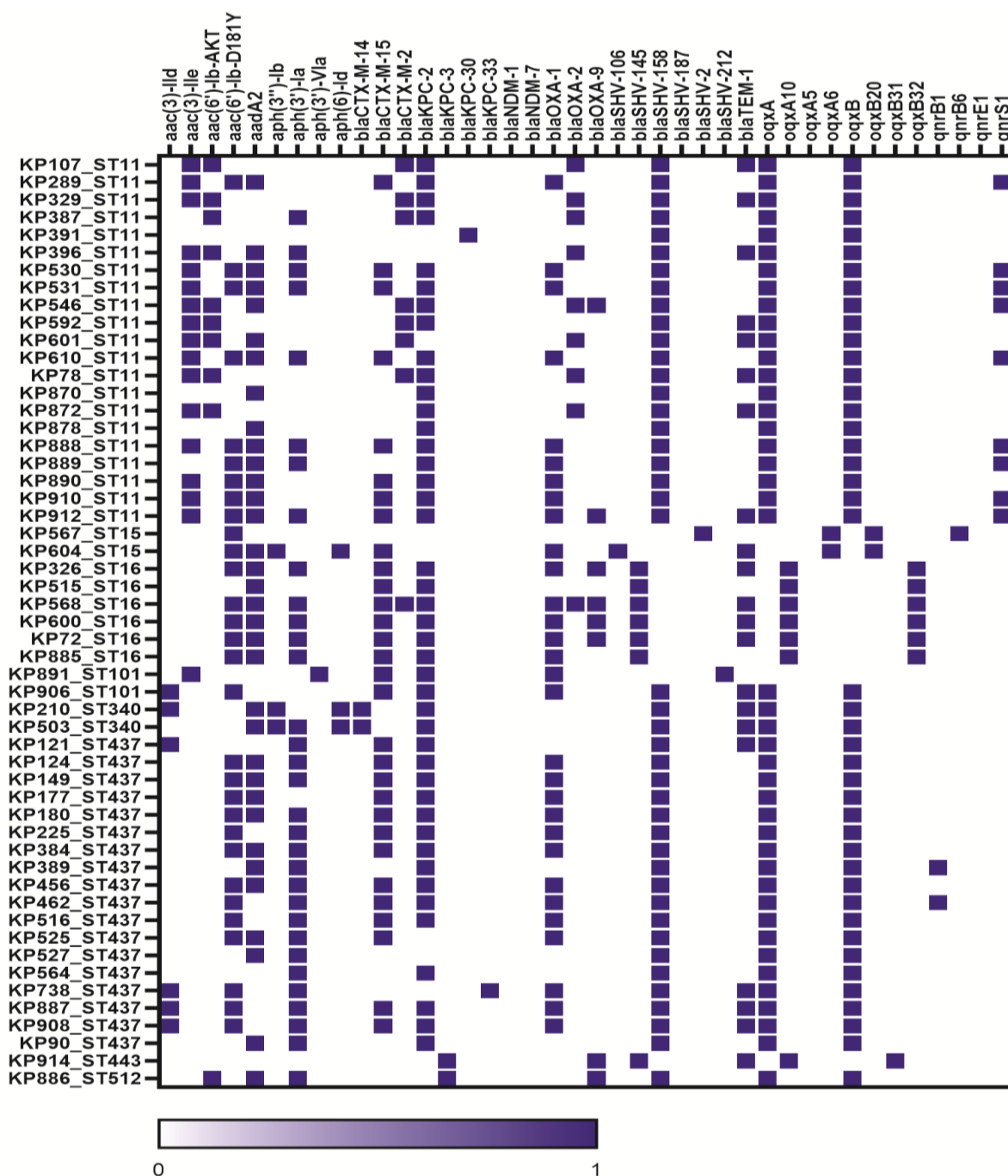
As menores taxas de resistência foram para amicacina (48%) e gentamicina (46%). Para ciprofloxacina, ceftazidima e cefepima as taxas de resistência foram altas, chegando a 98, 93 e 93% respectivamente (Figura 32).



Dos isolados de infecção (n=54), 100% foram resistentes a imipenem e Meropenem, 98% (53/54) foram resistentes a ciprofloxacina, 93% (50/54) foram resistentes a ceftazidima e cefepima, 44% (24/54) e 48% (26/54) foram resistentes a gentamicina e amicacina, respectivamente.

Figura 32. Perfil de suscetibilidade para as *Klebsiella pneumoniae* carreadoras de *bla_{KPC}* isoladas em amostras de infecção

Todos os isolados resistentes à ciprofloxacina, mas não os sensíveis, carregavam genes relacionados com a resistência a este antibiótico, *oqxAB* (53/54), *qnr* (2/54) (Figura 33) e mutações em *gyrA* e/ou *parC* (Tabela 5). O *oqxAB* é um gene de resistência à quinolona mediada por plasmídeo (PMQR) o qual codifica bombas de efluxo. Quando expressa pode reduzir em 4 vezes a suscetibilidade a antibióticos, incluindo quinolonas, fluoroquinolonas e trimethoprim.⁽⁶⁵⁾ Além do *oqxAB*, 2 isolados carregavam também o *qnr*, um outro PMQR cuja proteína atua sobre a DNA girase e a topoisomerase IV impedindo sua ação.⁽²⁴⁴⁾ Com exceção de um isolado (Kp914), os demais apresentaram alteração de aminoácidos que estão relacionados com a resistência as fluoroquinolonas (Tabela 5). A alteração dos aminoácidos Ser e Asp nas posições 83 e 87 de *gyrA* e Ser e Glu nas posições 80 e 84 de *parC*, respectivamente, levam a redução da afinidade das fluoroquinolonas aos sítios alvo de atuação que são representados pela DNA girase (*gyrA*) e a Topoisomerase IV (*parC*).⁽⁷²⁾ A substituição do aminoácido Ser por Isoleucina na posição 83 foi a principal alteração encontrada em GyrA reportada em 80% dos isolados (43/54). E a substituição do aminoácido Ser por Isoleucina na posição 80 foi a principal alteração encontrada em ParC reportada em 89% (48/54) dos isolados.



Quadrados em azul demonstram a presença do gene no isolado bacteriano.

Figura 33. Genes relacionados com a resistência de *Klebsiella pneumoniae* aos Aminoglicosídeos, Cefalosporinas, Fluoroquinolonas e Carbapenênicos encontrados nos isolados relacionados com a infecção

Tabela 5. Alterações de aminoácidos encontradas nos 54 isolados de infecção devido a mutações cromossômicas nos genes *gyrA* e *parC* que estão relacionados à resistência às fluoroquinolonas (ciprofloxacina)

Isolado	<i>gyrA</i> (Ser83)	<i>gyrA</i> (Asp87)	<i>parC</i> (Ser80)	<i>parC</i> (Glu84)	Isolado	<i>gyrA</i> (Ser83)	<i>gyrA</i> (Asp87)	<i>parC</i> (Ser80)	<i>parC</i> (Glu84)	Isolado	<i>gyrA</i> (Ser83)	<i>gyrA</i> (Asp87)	<i>parC</i> (Ser80)	<i>parC</i> (Glu84)
KP107	Ile	-	Ile	-	KP503	Ile	-	Ile	-	KP78	Ile	-	Ile	-
KP121	Ile	-	Ile	-	KP515	Phe	Asn	-	Lys	KP870	Ile	-	Ile	-
KP124	Ile	-	Ile	-	KP516	Ile	-	Ile	-	KP872	Ile	-	Ile	-
KP149	Ile	-	Ile	-	KP525	Ile	-	Ile	-	KP878	Ile	-	Ile	-
KP177	Ile	-	Ile	-	KP527	Ile	Tyr	Ile	-	KP885	Phe	Asn	Ile	-
KP180	Ile	-	Ile	-	KP530	Ile	-	Ile	-	KP886	Ile	-	Ile	-
KP210	Ile	-	Ile	-	KP531	Ile	-	Ile	-	KP887	Ile	-	Ile	-
KP225	Ile	-	Ile	-	KP546	Ile	-	Ile	-	KP888	Ile	-	Ile	-
KP289	Ile	-	Ile	-	KP564	Ile	Tyr	Ile	-	KP889	Ile	-	Ile	-
KP326	Ile	-	-	Lys	KP567	Phe	Ala	Ile	-	KP890	Ile	-	Ile	-
KP329	Ile	-	Ile	-	KP568	Phe	Asn	-	Lys	KP891	Tyr	Ala	Ile	-
KP384	Ile	-	Ile	-	KP592	Ile	-	Ile	-	KP90	Ile	-	Ile	-
KP387	Ile	Tyr	Ile	-	KP600	Phe	Asn	-	Lys	KP901	His	Ala	-	Lys
KP389	Ile	-	Ile	-	KP601	Ile	Tyr	Ile	-	KP906	Ile	-	Ile	-
KP391	Ile	-	Ile	-	KP604	Phe	Ala	Ile	-	KP908	Ile	-	Ile	-
KP396	His	Ala	Ile	-	KP610	Ile	-	Ile	-	KP910	Ile	-	Ile	-
KP456	Ile	-	Ile	-	KP72	Ile	-	Ile	-	KP912	Ile	-	Ile	-
KP462	Ile	-	Ile	-	KP738	Ile	-	Ile	-	KP914	-	-	-	-

Ser: Serina; Asp: Aspartato; Glu: Glutamato; Ile: Isoleucina; Tyr: Tirosina; Lys: Lisina; Asn: Asparagina; Ala: Alanina.

Para os aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), embora todos os isolados carreassem pelo menos um gene relacionado à resistência a esta classe de antibióticos, somente alguns apresentaram o fenótipo de resistência. No entanto, nós observamos que todos os isolados resistentes aos aminoglicosídeos carream o especificamente o gene *aac(6')-Ib-D181Y* (26/54) (Figura 33). O gene *aac(6')/Ib* codifica a enzima aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase tipo Ib que modifica e inativa os aminoglicosídeos. A *aac(6')/I* tem maior especificidade a amicacina e gentamicina, e pode ser carregado por elementos móveis de DNA como transposon.^(110,245)

Da mesma forma, para as cefalosporinas, todos os isolados resistentes apresentavam pelo menos uma ESBL que estão relacionadas à resistência a β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas (Figura 33). No entanto, mesmo carregando as ESBL, quatro isolados foram susceptíveis a estes dois antibióticos (4/54). As ESBL SHV, OXA, CTX-M e TEM são mecanismos de resistência amplamente dispersos em enterobactérias. Neste estudo, as ESBL encontradas com maior frequência foram TEM-1 (38%), CTX-M-15 (55%) e OXA-1 (55%).

Semelhante ao encontrado para *bla_{KPC}* em isolados susceptíveis aos carbapenêmicos nas análises de prevalência, para cefalosporinas e aminoglicosídeos também foram encontrados isolados suscetíveis carregando genes de resistência. Isto pode ser um problema na escolha da terapêutica, uma vez que ao serem escolhidos antibióticos para os quais a bactéria é suscetível, e ao entrarem em contato com esses antibióticos, a expressão desses genes pode levar ao fenótipo de resistência tornando ineficaz o tratamento escolhido.

3.8.2 Variantes de *bla_{KPC}* e seus contextos genômicos em *Klebsiella pneumoniae*

Todos os isolados de colonização e infecção selecionados eram resistentes aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) e carream o gene *bla_{KPC}*. Dos 124 isolados sequenciados, *bla_{KPC}* foi detectada em 108 isolados, e em 16 não foi possível identificar o gene, pois o gene não foi coberto pelo sequenciamento.

Neste estudo, foram identificadas quatro variantes de *bla_{KPC}* em *Klebsiella pneumoniae*: *bla_{KPC-2}*, *bla_{KPC-3}*, *bla_{KPC-30}* e *bla_{KPC-33}* (Figura 33). Como esperado, *bla_{KPC-2}* (102/124) foi o gene encontrado em frequência nos isolados, seguido por *bla_{KPC-3}* (3/124), *bla_{KPC-30}* (2/124) e *bla_{KPC-33}* (1/124) (Tabela 6).

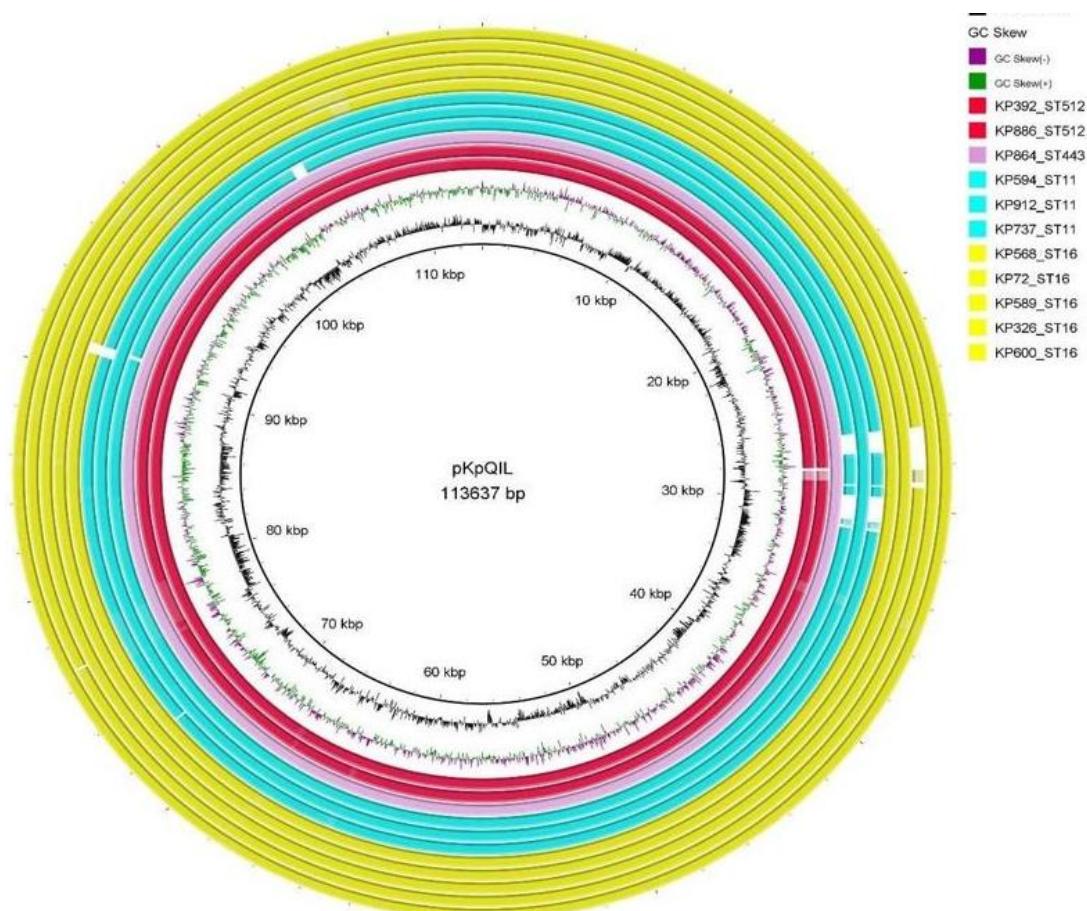
Tabela 6. *Klebsiella pneumoniae* carreadoras das variantes *bla_{KPC-3}* e *bla_{KPC-33}* e *bla_{KPC-30}* isoladas no Hospital Israelita Albert Einstein

Variante <i>bla_{KPC}</i>	Cepa	ST	Perfil PFGE	Paciente	Sítio de isolamento	Período
<i>bla_{KPC-3}</i>	KP864	443	69	54	Colonização intestinal	Julho/2020
	KP886	512	44 A	54	Secreção traqueal	Julho/2020
	KP914	443	17	36	Secreção traqueal	Outubro/2019
<i>bla_{KPC-30}</i>	KP378	11	60	10	Colonização intestinal	Janeiro/2016
	KP391	11	60	10	Abcesso abdominal	Janeiro/2016
<i>bla_{KPC-33}</i>	KP738	437	53 A	45	Secreção traqueal	Julho/2020

ST: tipo de sequência; PFGE: *pulsed-field gel electrophoresis*.

As carbapenemases KPC-2 e KPC-3 diferem entre si pela substituição dos aminoácidos Histidina pela Tirosina na posição 272 da cadeia de aminoácidos (H272Y).⁽⁸²⁾ Essa alteração pode aumentar em nove vezes eficiência catalítica da enzima para degradar a ceftazidima, e mais recentemente foi associada ao aumento da MIC para ceftazidima/avibactam.⁽⁸³⁻⁸⁶⁾ De maneira semelhante, a KPC-33 também tem sido recentemente associada ao aumento da MIC para ceftazidima/avibactam devido a alterações no Ω loop causado pela substituição do Asp pela tirosina na posição 179 (D179Y) em relação a KPC-2.^(88,246,247) Já a KPC-30, possui uma alteração de um aminoácido arginina por histidina na posição 6 (R6H) em relação a KPC-2. Esta alteração ocorre na região do peptídeo sinal que corresponde ao início da proteína e aparentemente não interfere no resultado da MIC ceftazidima/avibactam.⁽¹⁰⁸⁾

Dos 108 isolados carreadores de *bla_{KPC}* e sequenciados, 16 (14%) carreavam *bla_{KPC}* em plasmídeos semelhantes a pKpQIL (Figura 34) e 75 (70%) carreavam *bla_{KPC}* em plasmídeos semelhantes a pKPC_FCF_3SP.



Dezesseis isolados carregavam o gene *bla_{KPC}* em plasmídeo semelhantes a pKpQIL, dentre eles os isolados KP326, KP415, KP568, KP589, KP600, KP72, KP885 e KP901 pertencentes aos ST16; KP437, KP546, KP594, KP737, KP912 pertencentes ao ST11, KP914 e KP864 (ST443) e KP886 (ST512). KP864 e KP512 correspondem a isolados de colonização e infecção do mesmo paciente. Embora sejam de diferentes STs, estas cepas compartilham o mesmo plasmídeo.

Figura 34. Isolados carregando o gene *bla_{KPC}* em plasmídeos semelhantes a pKpQIL

Foi identificada uma possível transferência de mecanismos de resistência entre as *Klebsiella pneumoniae*, onde o mesmo plasmídeo carregando *bla_{KPC-3}* foi identificado em duas cepas isoladas da colonização intestinal e secreção traqueal do mesmo paciente (KP864 e KP886) (Figura 34 e Tabela 6). Embora sejam do mesmo paciente (paciente 54), resultados de PFGE e MLST demonstraram que são cepas diferentes (ST443 e ST512) que compartilham o mesmo plasmídeo, sugerindo uma transferência horizontal de mecanismos de resistência (Tabela 6). Isto demonstra que o corpo, e mais especificamente o intestino, pode ser um ambiente favorável para a troca de importantes elementos genéticos entre as bactérias.

As duas variantes de *bla_{KPC}* encontradas neste estudo *bla_{KPC-3}* e *bla_{KPC-33}* são clinicamente importantes, sendo os principais mecanismos descritos atualmente relacionados à resistência a Ceftazidima/Avibactam (CZA) em *Klebsiella*

pneumoniae.^(84,85,87,89,247,248) Essas variantes foram encontradas em plasmídeos semelhantes a pKpQIL com *Tn4401a* que podem potencializar a resistência aos carbapenêmicos devido a alterações na região a montante do *bla*_{KPC}.

Resultados parciais deste trabalho, ressaltando a prevalência de plasmídeos altamente similares a pKpQIL e pKPC_FCF3SP em nosso ambiente, foram publicados por nosso grupo.⁽¹⁰⁸⁾

4 DISCUSSÃO

A resistência bacteriana é um grande problema de saúde pública mundial devido à falta de opções para tratar infecções provocadas por bactérias MDR. Neste estudo nós identificamos que *Klebsiella pneumoniae* é uma das principais enterobactérias que contribuíram para o aumento das taxas de ERC no HIAE. Além da resistência aos carbapenêmicos, estes isolados apresentaram altas taxas de resistência a antimicrobianos de outras classes, como cefalosporinas de 3º geração (ceftazidima e cefepima), aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) e fluoroquinolonas (ciprofloxacina), tornando esses isolados MDR, os quais são caracterizados por apresentarem resistência a pelo menos um antimicrobiano em três classes diferentes.⁽⁶⁰⁾ A maior parte dos isolados identificados fenotipicamente como resistentes aos antibióticos carregavam fatores genéticos associados à resistência: *oqxAB*, *qnr* e mutações em *gyrA* e *parC* (resistência a quinolonas), *aac(6')Ib* (resistência a aminoglicosídeos) e ESBL OXA, TEM e SHV (resistência a cefalosporinas de 3º geração). A resistência aos carbapenêmicos foi correlacionada à presença de *bla*_{KPC}, principalmente *bla*_{KPC-2}, encontrada em 94% dos isolados. No entanto, também foram encontrados outros tipos de *bla*_{KPC} nos isolados analisados: *bla*_{KPC-3}, *bla*_{KPC-33} e *bla*_{KPC-30}. Em especial, a presença de *bla*_{KPC-3} e *bla*_{KPC-33} é preocupante pois são variantes de KPC cuja atividade pode levar também à resistência a ceftazidima-avibactam, uma combinação recentemente aprovada para uso no Brasil para o tratamento de infecções por bactérias MDR (junho 2018).^(84,85,87,89,247,248)

Aproximadamente 14% dos isolados carregavam *bla*_{KPC} incluindo *bla*_{KPC-3} e *bla*_{KPC-33} em plasmídeos semelhantes a pKpQIL no transposon *Tn4401a*, o qual contém alterações na região a montante do gene *bla*_{KPC} que podem potencializar a resistência aos carbapenêmicos. Além disso, é importante ressaltar que foram encontrados neste estudo alguns isolados que, embora sejam considerados suscetíveis aos carbapenêmicos pelo antibiograma, carregavam o gene *bla*_{KPC}. Isto é um problema uma vez que ao ser reportado que o isolado é susceptível aos carbapenêmicos, o paciente não é submetido a medidas de controle de disseminação, como o isolamento e a precaução de contato. Ao lado disso, a terapia com carbapenêmicos que poderá ser recomendada para estes pacientes com isolados susceptíveis, podem levar a expressão do gene *bla*_{KPC}, tornando ineficaz a terapia escolhida.

O intestino foi uma importante fonte de *Klebsiella pneumoniae* neste estudo, sendo os isolados predominantemente resistentes aos carbapenêmicos. Além disso, a colonização intestinal representou uma importante fonte primária para o desenvolvimento de infecções provocadas por KpKPC: em aproximadamente 85% dos pacientes com infecções subsequentes à colonização, os isolados de KpKPC presentes em ambos os episódios apresentavam mesmo perfil PFGE e MLST. Embora estes isolados carreguem mecanismos de virulência que são reportados como importantes para o estabelecimento das infecções, dentre eles o *ICEKp*, estes podem contribuir mas não explicam as infecções subsequentes à colonização uma vez que também foram amplamente encontrados nos isolados que não estavam associados às infecções, sugerindo assim que outros fatores podem estar envolvidos no progresso de colonização para infecção. A extensão da colonização por ERC por sua vez, vem sendo considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento de infecções.^(22,222,225) Em concordância, nós identificamos que as infecções subsequentes à colonização estavam associadas à altas cargas de ERC e bactérias produtoras de *bla_{KPC}*. Identificamos ainda que a estadia na UTI e unidade semi-Intensiva foram considerados fatores de risco para o desenvolvimento das infecções por KpKPC.

No Brasil, *Klebsiella pneumoniae* é um enterobactéria de grande importância clínica por apresentar altas taxas de resistência aos antimicrobianos e também por ser uma fonte primária de disseminação de importantes mecanismos de resistência como KPC.^(9,12) A KPC degrada os carbapenêmicos que são antimicrobianos de última escolha para o tratamento de infecções por bactérias MDR, e apresenta um grande potencial de disseminação principalmente por estar presente em elementos genéticos móveis, como plasmídeos.^(126,249) Atualmente, a KpKPC é epidêmica no Brasil e está associada a diversos surtos de infecções hospitalares.^(51,250,251)

O aumento constante da resistência aos carbapenêmicos em *Klebsiella pneumoniae* no HIAE foi observada principalmente a partir de 2010, quatro anos depois do primeiro relato de *bla_{KPC}* no Brasil.⁽⁹⁸⁾ Uma panorâmica semelhante foi observada em outros centros de saúde em São Paulo, onde a resistência aos carbapenêmicos passou de 6,8% em 2011 para 35,5% em 2015, sendo o gene *bla_{KPC}* identificado em 96,2% dos isolados.^(250,252) Esse aumento de KpRC no HIAE e em outros centros de São Paulo seguem o mesmo cenário observado em outros países a partir de 2010, correlacionando o aumento da resistência à disseminação de genes de resistência adquiridos, sendo que em 2019 e 2020 os números de genes de resistência adquiridos

aumentaram significativamente no mundo, semelhante ao encontrado também para ERC no HIAE em 2019 e 2020.⁽⁸⁾

Nos períodos onde foi observado maior incidência de ERC no HIAE foi indetificado um predomínio de isolados esporádicos de KpKPC, enquanto que nas infecções subsequentes à colonização foram identificados principalmente isolados endêmicos. Não foi observado o predomínio de um ST de KpKPC nos períodos de maior incidência de ERC e nas infecções subsequentes, em ambos os episódios quais estavam envolvidas cepas de KpKPC prevalentes em cada período: 2011-2015 (ST437) e 2016-2021 (ST11).

Embora o ST437 tenha sido frequentemente reportado em diversos estados brasileiros, incluindo São Paulo, Rio de Janeiro, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Sul, no nosso estudo e em um outro estudo realizado recentemente em 11 hospitais do Distrito Federal foi observado que cepas de *Klebsiella pneumoniae* ST11 tem se tornando cada vez mais prevalente, principalmente a partir de 2014.^(207,208,253) Interessantemente, cepas ST11 também se tornaram a população predominante de *Klebsiella pneumoniae* em um hospital localizado na Espanha, onde foi observada a substituição de *Klebsiella pneumoniae* ST405 por ST11 a partir de 2014.⁽²⁵⁴⁾ Essa alteração na população de KpKPC pode estar relacionada à mudanças na pressão seletiva no ambiente para as quais as cepas ST11 estariam mais adaptadas. De fato, todos os isolados do ST11 apresentam tipos capsulares diferentes (KL64 e KL15) do encontrado para o ST437 (KL36), e também a maioria dos isolados do ST11 encontrados recentemente no HIAE carregam o *locus ybt*, principalmente entre as cepas endêmicas. Estes fatores podem estar relacionado com a melhor adaptação do ST11 e também com a endemicidade dessas cepas no hospital. O ST11 de *Klebsiella pneumoniae* é considerado uma linhagem patogênica evolutivamente bem sucedida e uma das grandes preocupações em relação a este ST está relacionada ao grande arsenal de virulência e resistência que esta linhagem carrega ao mesmo tempo, diferentes de outras linhagens que carregam principalmente um ou outro arsenal, principalmente.⁽⁸⁾ E também é considerada um problema global devido à sua ampla disseminação principalmente na Europa e na China.^(5,8)

A colonização intestinal por KpKPC já é bem descrita como uma importante fonte de disseminação de bactérias resistentes no ambiente hospitalar.⁽²¹⁷⁻²¹⁹⁾ Estima-se que 20% dos pacientes colonizados por KpKPC sejam responsáveis por 80%

da contaminação ambiental e transmissão KpKPC no ambiente hospitalar.⁽²²²⁾ Atualmente, a colonização intestinal por ERC tem sido considerada também um fator de risco para o desenvolvimento de infecções.^(27,39,222,223) As bases para esta progressão da colonização para a infecção não estão esclarecidas, mas são reportados na literatura alguns fatores de virulência que contribuem para o estabelecimentos de infecções por *Klebsiella pneumoniae*, dentre eles ICEKp e *manBC*.^(8,152) O sideróforo Ybt é codificado pelos genes *fyuA*, *irp1* e *irp2* e o locus Ybt, e juntamente com o T4SS formam as ilhas de patogenicidade denominadas ICE.⁽¹⁷⁹⁾ Em *Klebsiella pneumoniae*, esse conjunto de genes é denominado ICEKp. O ICEKp tem um papel importante na captação de ferro de proteínas do hospedeiro, fundamental para o metabolismo e crescimento bacteriano, sendo geralmente encontrado em linhagens Hv de *Klebsiella pneumoniae* causadoras de infecção, muitas vezes associado à proteína genotóxica Clb.⁽¹⁸⁴⁾ Além disso, os ICEKp podem ser transferidos para outras bactérias por transferência horizontal devido a presença do T4SS, o qual é responsável pela mobilização de DNA.^(179,185) No HIAE, foi observado que as cepas de *Klebsiella pneumoniae* ganharam ou perderam ICEKp ao longo do tempo, mas a maioria das cepas isoladas recentemente carregavam este importante mecanismo de virulência. Isto demonstra que os isolados que estão circulando no hospital atualmente carregam, concomitantemente, importantes mecanismos de virulência (ICEKp) e resistência (*bla_{KPC}*). Mas, surpreendentemente, *ybt* foi encontrado principalmente em cepas ST11 e em uma frequência semelhante nas cepas envolvidas ou não com as infecções, e *ybt* associado com *clb* foi encontrado em maior frequência nos isolados não envolvidos com as infecções.

Também, foram encontradas cepas que apresentavam alterações em genes reguladores da síntese capsular (*manBC*). Essas alterações estavam presentes em 49% das cepas do ST11 e 91% das cepas do ST16, das quais 29 e 60% das cepas estavam envolvidas com as infecções, respectivamente. Alterações nestes genes estão relacionadas com o aumento da expressão de genes da CPS levando à produção de uma hipercápsula que contribui para a colonização intestinal, e faz com que os isolados sejam eliminados em grandes quantidades nas fezes conferindo o fenótipo de superdispersor ao hospedeiro.⁽¹⁵²⁾ Nas cepas do ST16, além de estarem relacionados com mais da metade das infecções, a presença deste mecanismo de virulência associado à superdispersão dessa linhagem no ambiente hospitalar poderá contribuir para a endemicidade de um ST de alto risco relacionado com altas taxas de mortalidade (95%).⁽²⁰⁾ No entanto, aproximadamente metade das cepas que não carregavam ICEKp e

alterações em *manBC*, também estavam envolvidos com infecções. Ao contrário do esperado, os isolados envolvidos com as infecções também não apresentaram um número maior de genes relacionados com a virulência em comparação com os isolados presentes somente na colonização, em concordância com o reportado recentemente.⁽²⁴⁾ Neste sentido, tanto o tipo mecanismo de virulência quanto o número de genes presentes não explicam as infecções subsequentes à colonização uma vez que os mecanismos de virulência foram encontrados em maior ou igual frequência nos isolados que não estavam envolvidos com as infecções.

A colonização intestinal por *Klebsiella pneumoniae* tem sido relacionada ao desenvolvimento de infecções de difícil tratamento. Recentemente foi reportado que pacientes com fatores de risco semelhantes apresentaram diferentes cargas intestinais de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e carreadora de *bla_{OXA-48}* (KpOXA), e aqueles que desenvolveram infecções por KpOXA carregavam alta carga intestinal de KpOXA detectadas antes da infecção.⁽²⁷⁾ Ao lado disso, a colonização por patógenos como KpKPC, geralmente está associada ao consumo de antimicrobianos de amplo espectro e permanência prolongada no ambiente hospitalar.⁽²⁵⁵⁾ Em concordância, nossos resultados demonstram que pacientes que desenvolveram infecções apresentaram altas cargas intestinais de ERC e bacKPC, quando comparados com aqueles que não desenvolveram infecção, demonstrando que a densidade da colonização representa um importante papel no desenvolvimento das infecções.⁽²⁵⁶⁾

A permanência na UTI e na unidade Semi-intensiva também foi considerada um fator de risco para o desenvolvimento das infecções, como já descrito na literatura.^(27,257,258) A permanência prolongada no hospital e o consumo de antibióticos de amplo espectro são os principais fatores de risco clínicos relacionados à colonização intestinal por KpKPC, uma vez que o paciente torna-se mais suscetível à colonização por bactérias nosocomiais devido ao rompimento da homeostase intestinal do hospedeiro.^(27,257,258) Esta disbiose provocada pelo consumo de antibióticos pode ocasionar uma redução na diversidade de espécies da microbiota do hospedeiro que previnem o crescimento de enterobactérias patogênicas.^(27,255,259,260) Por exemplo, pacientes com altas cargas intestinais de bactérias carreadoras de OXA-48 apresentaram uma redução significativa da diversidade bacteriana intestinal, observando-se o predomínio da família *Enterobacteriaceae*, enquanto que em pacientes com baixas cargas intestinais de bactérias carreadoras de OXA-48, a família

Enterobacteriaceae representou uma pequena fração e a microbiota era representada por uma maior diversidade de famílias bacterianas.⁽²⁷⁾

Um estudo *in vivo* demonstrou que o aumento da colonização intestinal por *Klebsiella pneumoniae* desencadeou a colite devido ao aumento de potentes citocinas pró inflamatórias como COX-2, IL-6, IL-1 β & TNF- α e a ativação da via de NF- κ B, além dos altos níveis de peroxidação de lipídeos.⁽²²⁶⁻²²⁸⁾ Também, foi observada uma diminuição na expressão de proteínas relacionadas a junção celular (*tight-junction*) como claudinas-1, junções de oclusão-1 e ocludinas, permitindo assim que *Klebsiella pneumoniae* invadisse facilmente a mucosa. Além disso, o LPS presente na bactéria pode levar à indução da produção de óxido nítrico e COX-2 que lesionam o tecido do hospedeiro. A presença de *Klebsiella pneumoniae* no intestino tem sido relacionada a diversas doenças inflamatórias intestinais como colite ulcerativa, doença de Crohn e cânceres colorretal.^(183,226,261,262) A literatura atual sugere portanto que a disbiose da microbiota intestinal com predominância de uma população de *Klebsiella pneumoniae* pode levar à inflamação e gerar danos permanentes na mucosa, o que pode facilitar a translocação de *Klebsiella pneumoniae* do intestino para outros sítios do corpo.^(227,263,264) De fato, observou-se que a administração de bactérias produtoras de ácido láctico, como *Lactobacillus johnsonii*, reduziram a expressão de marcadores inflamatórios e a peroxidação lipídica e aumentaram a expressão das proteínas relacionadas à junção celular, diminuindo a permeabilidade do intestino e assim demonstrando um efeito protetor na mucosa intestinal.^(227,229) O Lactotiol é um prebiótico que diminui o pH intestinal e favorece o crescimento da microbiota acidofílica, o que leva à inibição do crescimento de enterobactérias patogênicas.⁽²⁶⁵⁾ Lactotiol associado com *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* foi uma combinação promissora para descolonização intestinal de pacientes colonizados por enterobactérias produtoras de OXA-48.⁽²³⁰⁾

Atualmente, a recolonização intestinal através da administração de probióticos e prebióticos têm surgido com uma alternativa aos antibióticos para a descolonização intestinal de pacientes com *Klebsiella pneumoniae* carreadoras de carbapenemase.^(230,231) Sendo assim, técnicas voltadas para a quantificação da carga intestinal de ERC têm surgido como métodos promissores para apontar riscos de infecções posteriores à colonização ou para avaliar a eficácia de um tratamento de recolonização intestinal.^(27,230) O uso de probióticos em pacientes colonizados por ERC é atualmente uma das estratégias mencionadas nas diretrizes do EUCAST e pode ser

mais explorada em grupos selecionados de pacientes hospitalizados para reduzir a carga intestinal de bactérias patogênicas.⁽²⁵⁾

Com as limitadas opções para tratar infecções provocadas por bactérias MDR, dentre elas KpKPC, identificar o risco de infecções e intervir para que elas não ocorram têm sido reconhecida como uma nova abordagem terapêutica.⁽²⁾ A combinação da genômica comparativa e vigilância epidemiológica molecular permite caracterizar e rastrear as cepas de alto risco, além de permitir identificar reservatórios e vias de transmissão. Além disso, sendo a densidade da colonização intestinal um importante fator de risco para infecções, compreender os mecanismos moleculares envolvidos com a extensão da colonização intestinal e com a transição colonização-infecção pode lançar bases para novas abordagens terapêuticas. A implementação de novas estratégias de controle de infecção hospitalar com foco na colonização intestinal podem contribuir para um melhor prognóstico e novas práticas de cuidado ao paciente.

Dentre as limitações deste trabalho ressaltamos que a classificação dos isolados como agentes infecciosos foi baseada na presença destes isolados em sítios considerados estéreis ou extra-intestinais, devido à falta de informações disponíveis sobre sintomas que caracterizassem uma infecção. Também, a seleção dos isolados para análises moleculares foi limitada a isolados disponíveis conforme protocolos de seleção de isolados para banco de cepas do laboratório clínico do HIAE. Desta forma, a amostra disponível para este estudo correspondeu a 27,5% (176/651) das KpKPC isoladas na UTI e Semi-UTI do HIAE, e alguns períodos importantes, como agosto a outubro de 2014, onde foram observados aumentos de ERC acima da média institucional, não foram representados.

5 CONCLUSÕES

1. Os isolados endêmicos identificados neste estudo pertenciam principalmente ao ST437 e os isolados esporádicos pertenciam principalmente ao ST11. No entanto, foi observado uma mudança na população de KpKPC ao longo do tempo e, atualmente, cepas do ST11 são mais prevalentes dentre os isolados endêmicos e esporádicos no Hospital Israelita Albert Einstein;

2. A resistência aos carbapenêmicos pode estar relacionada principalmente à presença de *bla_{KPC}* nos isolados estudados, em especial *bla_{KPC-2}*. A resistência a outras classes de antibióticos pode estar relacionada a determinantes genéticos específicos encontrados nos isolados através do sequenciamento de genomas: beta-lactamases de espectro estendido para Cefalosporinas, genes *oqxAB* e *qnr* e mutações em *gyrA* e *parC* para Ciprofloxacina e o gene *aac(6')/b* para Aminoglicosídeos;

3. Embora tenham sido identificados, por meio do sequenciamento de genomas, genes de importância reconhecida na virulência de *Klebsiella pneumoniae*, como *ybt*, estes foram encontrados em frequência similar nos isolados de colonização e dentre nos isolados associados a episódios de infecção subsequente à colonização. Conclui-se portanto que a presença destes genes, por si só, não é capaz de explicar a transição de colonização para infecção na população estudada;

4. O aumento da carga intestinal de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e bactérias carreadoras de *bla_{KPC}* foram significativamente associados com o desenvolvimento de infecções subseqüentes à colonização neste estudo.

6 REFERÊNCIAS

1. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(3):297-308.
2. Jung HJ, Littmann ER, Seok R, Leiner IM, Taur Y, Peled J, et al. Genome-wide screening for enteric colonization factors in carbapenem-resistant ST258 *Klebsiella pneumoniae*. *mBio.* 2019;10(2):e02663-18.
3. Bassetti M, Peghin M, Vena A, Giacobbe DR. Treatment of infections due to MDR gram-negative bacteria. *Front Med (Lausanne).* 2019;6:74.
4. Manohar P, Tamhankar AJ, Lundborg CS, Nachimuthu R. Therapeutic characterization and efficacy of bacteriophage cocktails infecting *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter* species. *Front Microbiol.* 2019;10:574.
5. Wyres KL, Lam MM, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(6):344-59.
6. Silva PP, Silva FA, Rodrigues CA, Souza LP, Lima EM, Pereira MH, et al.; Nucleus of Hospital Research Study Collaborators. Geographical information system and spatial-temporal statistics for monitoring infectious agents in hospital: a model using *Klebsiella pneumoniae* complex. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2021;10(1):92.
7. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* population genomics and antimicrobial-resistant clones. *Trends Microbiol.* 2016;24(12):944-56.
8. Lam MM, 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.
9. U.S. Department of Health and Human Services; Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention; 2019. Available from: <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>
10. Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanés C. SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(10):2856-61.
11. Sirot J, Chanal C, Petit A, Sirot D, Labia R, Gerbaud G. *Klebsiella pneumoniae* and other enterobacteriaceae producing novel plasmid-mediated beta-lactamases markedly active against third-generation cephalosporins: epidemiologic studies. *Rev Infect Dis.* 1988;10(4):850-9.
12. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(4):228-36.
13. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 2011;19(12):588-95.
14. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):161-8.
15. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):1151-61.
16. Sampaio JL, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol.* 2016;47(Suppl 1):31-7.
17. Campos AC, Albiero J, Ecker AB, Kuroda CM, Meirelles LE, Polato A, et al. Outbreak of

Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: a systematic review. *Am J Infect Control*. 2016;44(11):1374-80.

18. 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.

19. Shankar C, Jacob JJ, Vasudevan K, Biswas R, Manesh A, Sethuvel DP, et al. Emergence of multidrug resistant hypervirulent ST23 *Klebsiella pneumoniae*: multidrug resistant plasmid acquisition drives evolution. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:575289.

20. Andrey DO, Dantas P, Martins WB, Carvalho F, Almeida LG, 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.

21. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017;16(1):18.

22. 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):e00261-16.

23. Giannella M, Trecarichi EM, Rosa FG, Del Bono V, Bassetti M, Lewis RE, et al. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection among rectal carriers: a prospective observational multicentre study. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(12):1357-62.

24. Lewis JM, Mphasa M, Banda R, Beale MA, Mallewa J, Heinz E, et al. Genomic and antigenic diversity of carried *Klebsiella pneumoniae* isolates mirrors that of invasive isolates in Blantyre, Malawi. *Microb Genom*. 2022;8(3).

25. Tacconelli E, Mazzaferri F, de Smet AM, Bragantini D, Eggimann P, Huttner BD, et al. ESCMID-EUCIC clinical guidelines on decolonization of multidrug-resistant gram-negative bacteria carriers. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(7):807-17.

26. Shimasaki T, Seekatz A, Bassis C, Rhee Y, Yelin RD, Fogg L, et al.; Centers for Disease Control and Prevention Epicenters Program. Increased relative abundance of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* within the gut microbiota is associated with risk of bloodstream infection in long-term acute care hospital patients. *Clin Infect Dis*. 2019;68(12):2053-9.

27. Lázaro-Perona F, Rodríguez-Tejedor M, Ruiz-Carrascoso G, Díaz-Pollán B, Loeches B, Ramos-Ramos JC, et al. Intestinal loads of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in colonized patients determined from surveillance rectal swabs. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27(8):1169.e7-1169.e12.

28. Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016;66(12):5575-99.

29. 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 USA*. 2015;112(27):E3574-81.

30. Long SW, Linson SE, Ojeda Saavedra M, Cantu C, Davis JJ, Brettin T, et al. Whole-genome sequencing of human clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates reveals misidentification and misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. *mSphere*. 2017;2(4):e00290-17.

31. Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Brisse S. Identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* and related phylogroups by MALDI-TOF mass spectrometry. *Front Microbiol.* 2018;9:3000.
32. 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.
33. 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.
34. Heinz E, Ejaz H, Bartholdson Scott J, Wang N, Gujran S, Pickard D, et al. Resistance mechanisms and population structure of highly drug resistant *Klebsiella* in Pakistan during the introduction of the carbapenemase NDM-1. *Sci Rep.* 2019;9(1):2392.
35. Gorrie CL, Mirceta M, Wick RR, Judd LM, Wyres KL, Thomson NR, et al. Antimicrobial-resistant *Klebsiella pneumoniae* carriage and infection in specialized geriatric care wards linked to acquisition in the referring hospital. *Clin Infect Dis.* 2018;67(2):161-70.
36. Zadoks RN, Griffiths HM, Munoz MA, Ahlstrom C, Bennett GJ, Thomas E, et al. Sources of *Klebsiella* and *Raoultella* species on dairy farms: be careful where you walk. *J Dairy Sci.* 2011;94(2):1045-51.
37. Marques C, Belas A, Aboim C, Cavaco-Silva P, Trigueiro G, Gama LT, et al. Evidence of sharing of *Klebsiella pneumoniae* strains between healthy companion animals and cohabiting humans. *J Clin Microbiol.* 2019;57(6):e01537-18.
38. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2018;45:131-9.
39. Gorrie CL, Mirceta 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.
40. Mo Y, Hernandez-Koutoucheva A, Musicha P, Bertrand D, Lye D, Tek NO, et al. Carriage duration of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a hospital cohort - implications for infection control measures. *medRxiv* 19001479; doi: <https://doi.org/10.1101/19001479>.
41. Chung DR, Lee H, Park MH, Jung SI, Chang HH, Kim YS, et al. Fecal carriage of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains closely related to liver abscess isolates in Koreans living in Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(4):481-6.
42. Lin YT, Siu LK, Lin JC, Chen TL, Tseng CP, Yeh KM, et al. Seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae* colonizing the intestinal tract of healthy Chinese and overseas Chinese adults in Asian countries. *BMC Microbiol.* 2012;12(1):13.
43. Sun QL, Gu D, Wang Q, Hu Y, Shu L, Hu J, et al. Dynamic Colonization of *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Gastrointestinal Tract of Intensive Care Patients. *Front Microbiol.* 2019;10:230.
44. Huynh BT, Passet V, Rakotondrasoa A, Diallo T, Kerleguer A, Hennart M, et al. *Klebsiella pneumoniae* carriage in low-income countries: antimicrobial resistance, genomic diversity and risk factors. *Gut Microbes.* 2020;11(5):1287–99.
45. Shon AS, Bajwa RP, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence.* 2013;4(2):107-18.
46. Siu LK, Yeh KM, Lin JC, Fung CP, Chang FY. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. *Lancet Infect Dis.* 2012;12(11):881-7.
47. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(4):589-603.

48. Daikos GL, Tsaousi S, Tzouveleakis LS, Anyfantis I, Psychogiou M, Argyropoulou A, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(4):2322-8.
49. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al.; Burden of AMR Collaborative Group. 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.
50. Falcone M, Russo A, Iacovelli A, Restuccia G, Ceccarelli G, Giordano A, et al. Predictors of outcome in ICU patients with septic shock caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(5):444-50.
51. Raro OH, Silva RM, Rodrigues Filho EM, Sukiennik TC, Stadnik C, Dias CA, 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.
52. Okomo U, Akpalu EN, Le Doare K, Roca A, Cousens S, Jarde A, et al. Aetiology of invasive bacterial infection and antimicrobial resistance in neonates in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis in line with the STROBE-NI reporting guidelines. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(11):1219-34.
53. Zaidi AK, Huskins WC, Thaver D, Bhutta ZA, Abbas Z, Goldmann DA. Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. *Lancet*. 2005;365(9465):1175-88.
54. Friedlaender C. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. *Virchows Arch*. 1882;87(2):319-24.
55. 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.
56. World Bank Group. Drug-resistant infections: a threat to our economic future. Washington (DC): World Bank Group; 2017.
57. World Health Organization; Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance. No time to wait: securing the future from drug-resistant infections, 2019. [S.l.]: Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance; 2019 [cited 2022 Mar 11]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections>
58. Organization WH. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. World Health Organization; 2017.
59. Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in enterobacteriaceae, pseudomonas and acinetobacter. *Trends Microbiol*. 2006;14(9):413–20.
60. 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.
61. Perez F, El Chakhtoura NG, Yasmin M, Bonomo RA. Polymyxins: to combine or not to combine? *Antibiotics (Basel)*. 2019;8(2):E38.
62. Yamamoto M, Pop-Vicas AE. Treatment for infections with carbapenem-resistant enterobacteriaceae: what options do we still have? *Crit Care*. 2014;18(3):229.
63. Luterbach CL, Boshe A, Henderson HI, Cober E, Richter SS, Salata RA, et al. The role of trimethoprim/sulfamethoxazole in the treatment of infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Open Forum Infect Dis*. 2018;6(1):ofy351.

64. Ito R, Mustapha MM, Tomich AD, Callaghan JD, McElheny CL, Mettus RT, et al. Widespread fosfomycin resistance in gram-negative bacteria attributable to the chromosomal *fosA* gene. *mBio*. 2017;8(4):e00749-17.
65. Li J, Zhang H, Ning J, Sajid A, Cheng G, Yuan Z, et al. The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1):44.
66. Fajardo-Lubián A, Ben Zakour NL, Agyekum A, Qi Q, Iredell JR. Host adaptation and convergent evolution increases antibiotic resistance without loss of virulence in a major human pathogen. *PLoS Pathog*. 2019;15(3):e1007218.
67. Ford PJ, Avison MB. Evolutionary mapping of the SHV beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent *bla*SHV mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(1):69-75.
68. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A Review of SHV extended-spectrum β -lactamases: neglected yet ubiquitous. *Front Microbiol*. 2016;7:1374.
69. Nicolas-Chanoine MH, Mayer N, Guyot K, Dumont E, Pagès JM. Interplay between membrane permeability and enzymatic barrier leads to antibiotic-dependent resistance in *Klebsiella Pneumoniae*. *Front Microbiol*. 2018;9:1422.
70. Xu Q, Jiang J, Zhu Z, Xu T, Sheng ZK, Ye M, et al. Efflux pumps AcrAB and OqxAB contribute to nitrofurantoin resistance in an uropathogenic *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;54(2):223-7.
71. He F, Fu Y, Chen Q, Ruan Z, Hua X, Zhou H, et al. Tigecycline susceptibility and the role of efflux pumps in tigecycline resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119064.
72. Park KS, Yang HS, Nam YS, Lee HJ. Mutations in DNA Gyrase and topoisomerase IV in ciprofloxacin-nonsusceptible extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Lab*. 2017;63(3):535-41.
73. Cain AK, Boinett CJ, Barquist L, Dordel J, Fookes M, Mayho M, et al. Morphological, genomic and transcriptomic responses of *Klebsiella pneumoniae* to the last-line antibiotic colistin. *Sci Rep*. 2018;8(1):9868.
74. Wong JL, Romano M, Kerry LE, Kwong HS, Low WW, Brett SJ, et al. OmpK36-mediated carbapenem resistance attenuates ST258 *Klebsiella pneumoniae* in vivo. *Nat Commun*. 2019;10(1):3957.
75. Lunha K, Chanawong A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Charoensri N, Wonglakorn L, et al. High-level carbapenem-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* with a novel OmpK36 variant and low-level, carbapenem-resistant, non-porin-deficient, OXA-181-producing *Escherichia coli* from Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;85(2):221-6.
76. Rozwandowicz M, Brouwer MS, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(5):1121-37.
77. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(3):440-58.
78. Ambler RP, Coulson AF, Frère JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J*. 1991;276(Pt 1):269-70.
79. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(6):1211-33.
80. Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended Spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology. *Curr Issues Mol Biol*. 2015;17:11-21.
81. National Library of Medicine. Pathogen detection. Bethesda (MD): National Library of

Medicine; 2016 [cited 2021 Aug 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/>

82. Woodford N, Tierno PM Jr, Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(12):4793-9.
83. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3365-70.
84. Manageiro V, Ferreira E, Almeida J, Barbosa S, Simões C, Bonomo RA, et al.; Antibiotic Resistance Surveillance Program in Portugal (ARSIP). Predominance of KPC-3 in a survey for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(6):3588-92.
85. Mehta SC, Rice K, Palzkill T. Natural variants of the KPC-2 Carbapenemase have evolved increased catalytic efficiency for ceftazidime hydrolysis at the cost of enzyme stability. *PLoS Pathog*. 2015;11(6):e1004949.
86. Alba J, Ishii Y, Thomson K, Moland ES, Yamaguchi K. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(11):4760-2.
87. Bianco G, Boattini M, Iannaccone M, Cavallo R, Costa C. Bloodstream infection by two subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* ST1685 carrying KPC-33 or KPC-14 following ceftazidime/avibactam treatment: considerations regarding acquired heteroresistance and choice of carbapenemase detection assay. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(10):3075-6.
88. Shi Q, Yin D, Han R, Guo Y, Zheng Y, Wu S, et al. Emergence and recovery of ceftazidime-avibactam resistance in blaKPC-33-Harboring *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 isolates in China. *Clin Infect Dis*. 2020;71 Suppl 4:S436-9.
89. Li D, Li K, Dong H, Ren D, Gong D, Jiang F, et al. Ceftazidime-avibactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* Sequence type 11 due to a mutation in plasmid-borne bla kpc-2 to bla kpc-33, in Henan, China. *Infect Drug Resist*. 2021;14:1725-31.
90. Bush K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr Opin Microbiol*. 2010;13(5):558-64.
91. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al.; European Network on Carbapenemases. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(5):413-31.
92. Kaiser RM, Castanheira M, Jones RN, Tenover F, Lynfield R. Trends in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-positive *K. pneumoniae* in US hospitals: report from the 2007-2009 SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;76(3):356-60.
93. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(9):821-30.
94. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva: World Health Organization; 2014.
95. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP; Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(4):1553-5.
96. Robledo IE, Aquino EE, Vázquez GJ. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother*.

2011;55(6):2968-70.

97. Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):5873-84.

98. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(1):333-4.

99. Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(6):2702.

100. Seki LM, Pereira PS, de Souza MP, Conceição MS, Marques EA, Porto CO, et al. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70(2):274-7.

101. Arend LN, Toledo P, Pilonetto M, Tuon FF. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in different facilities in Southern Brazil. *Am J Infect Control*. 2015;43(2):137-40.

102. Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, Dougherty BA, He W, Della-Latta P, et al. Genetic organization of transposase regions surrounding blaKPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(5):1998-2004.

103. Chen L, Chavda KD, Fraimow HS, Mediavilla JR, Melano RG, Jacobs MR, et al. Complete nucleotide sequences of blaKPC-4- and blaKPC-5-harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(1):269-76.

104. Leavitt A, Chmelnitsky I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Complete nucleotide sequence of KPC-3-encoding plasmid pKpQIL in the epidemic *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(10):4493-6.

105. Chen L, Chavda KD, Al Laham N, Melano RG, Jacobs MR, Bonomo RA, et al. Complete nucleotide sequence of a blaKPC-harboring IncI2 plasmid and its dissemination in New Jersey and New York hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(10):5019-25.

106. Bryant KA, Van Schooneveld TC, Thapa I, Bastola D, Williams LO, Safranek TJ, et al. KPC-4 is encoded within a truncated Tn4401 in an IncL/M plasmid, pNE1280, isolated from *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(1):37-41.

107. Chen L, Chavda KD, Melano RG, Jacobs MR, Koll B, Hong T, et al. Comparative genomic analysis of KPC-encoding pKpQIL-like plasmids and their distribution in New Jersey and New York Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(5):287-7.

108. Migliorini LB, de Sales RO, Koga PC, Doi AM, Poehlein A, Toniolo AR, et al. Prevalence of blaKPC-2, blaKPC-3 and blaKPC-30-carrying plasmids in *Klebsiella pneumoniae* isolated in a Brazilian hospital. *Pathogens*. 2021;10(3):332.

109. Hidalgo-Grass C, Warburg G, Temper V, Benenson S, Moses AE, Block C, et al. KPC-9, a novel carbapenemase from clinical specimens in Israel. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):6057-9.

110. Warburg G, Hidalgo-Grass C, Partridge SR, Tolmasky ME, Temper V, Moses AE, et al. A carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* epidemic clone in Jerusalem: sequence type 512 carrying a plasmid encoding aac(6')-Ib. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(4):898-901.

111. García-Fernández A, Villa L, Carta C, Venditti C, Giordano A, Venditti M, et al. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(4):2143-5.

112. Baraniak A, Grabowska A, Izdebski R, Fiett J, Herda M, Bojarska K, et al.; KPC-PL Study Group. Molecular characteristics of KPC-producing Enterobacteriaceae at the early stage of their dissemination in Poland, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(12):5493-9.
113. Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, et al.; Israeli KPC Kpn study group. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(2):818-20.
114. Leavitt A, Chmelnitsky I, Ofek I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Plasmid pKpQIL encoding KPC-3 and TEM-1 confers carbapenem resistance in an extremely drug-resistant epidemic *Klebsiella pneumoniae* strain. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(2):243-8.
115. O'Hara JA, Hu F, Ahn C, Nelson J, Rivera JI, Pasculle AW, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Escherichia coli*: occurrence of ST131-fimH30 subclone harboring pKpQIL-like IncFIIk plasmid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):4234-7.
116. Papagiannitsis CC, Di Pilato V, Giani T, Giakkoupi P, Riccobono E, Landini G, et al. Characterization of KPC-encoding plasmids from two endemic settings, Greece and Italy. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(10):2824-30.
117. Doumith M, Findlay J, Hirani H, Hopkins KL, Livermore DM, Dodgson A, et al. Major role of pKpQIL-like plasmids in the early dissemination of KPC-type carbapenemases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(8):2241-8.
118. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2227-38.
119. Sarno R, McGillivray G, Sherratt DJ, Actis LA, Tolmasky ME. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multiresistance plasmid pJHCMW1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(11):3422-7.
120. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1257-63.
121. Huang J, Hu X, Zhao Y, Shi Y, Ding H, Wu R, et al. Comparative analysis of bla KPC expression in Tn4401 transposons and the Tn3-Tn4401 chimera. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(5):e02434-18.
122. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005;63(3):219-28.
123. Pérez-Chaparro PJ, Cerdeira LT, Queiroz MG, de Lima CP, Levy CE, Pavez M, et al. Complete nucleotide sequences of two blaKPC-2-bearing IncN Plasmids isolated from sequence type 442 *Klebsiella pneumoniae* clinical strains four years apart. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(5):2958-60.
124. Stoesser N, Sheppard AE, Peirano G, Anson LW, Pankhurst L, Sebra R, et al. Genomic epidemiology of global *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Escherichia coli*. *Sci Rep.* 2017;7(1):5917.
125. Ho WS, Yap KP, Yeo CC, Rajasekaram G, Thong KL. The complete sequence and comparative analysis of a multidrug-resistance and virulence multireplicon IncFII plasmid pEC302/04 from an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* EC302/04 indicate extensive diversity of IncFII plasmids. *Front Microbiol.* 2016;6:1547.
126. Osborn AM, da Silva Tatley FM, Steyn LM, Pickup RW, Saunders JR. Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons. *Microbiology (Reading).* 2000;146(Pt 9):2267-75.
127. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiology and molecular biology reviews. Microbiol Mol Biol Rev.* 2016;80(3):629-

61.

128. Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, Jenney A, Follador R, Thomson NR, et al. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microb Genom.* 2016;2(12):e000102.
129. Choi M, Hegerle N, Nkeze J, Sen S, Jamindar S, Nasrin S, et al. The diversity of lipopolysaccharide (O) and capsular polysaccharide (K) antigens of invasive *Klebsiella pneumoniae* in a multi-country collection. *Front Microbiol.* 2020;11:1249.
130. Bachman MA, Lenio S, Schmidt L, Oyler JE, Weiser JN. Interaction of lipocalin 2, transferrin, and siderophores determines the replicative niche of *Klebsiella pneumoniae* during pneumonia. *mBio.* 2012;3(6):e00224-11.
131. Chen KM, Chiang MK, Wang M, Ho HC, Lu MC, Lai YC. The role of *pgaC* in *Klebsiella pneumoniae* virulence and biofilm formation. *Microb Pathog.* 2014;77:89-99.
132. Ho JY, Lin TL, Li CY, Lee A, Cheng AN, Chen MC, et al. Functions of some capsular polysaccharide biosynthetic genes in *Klebsiella pneumoniae* NTUH K-2044. *PLoS One.* 2011;6(7):e21664.
133. Wu MC, Lin TL, Hsieh PF, Yang HC, Wang JT. Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess. *PLoS One.* 2011;6(8):e23500.
134. Zheng JX, Lin ZW, Chen C, Chen Z, Lin FJ, Wu Y, et al. Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of *wcaG*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:21.
135. Cannatelli A, Di Pilato V, Giani T, Arena F, Ambretti S, Gaibani P, et al. In vivo evolution to colistin resistance by *PmrB* sensor kinase mutation in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* is associated with low-dosage colistin treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(8):4399-403.
136. Lippa AM, Goulian M. Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS Genet.* 2009;5(12):e1000788.
137. Hsieh PF, Lin TL, Yang FL, Wu MC, Pan YJ, Wu SH, et al. Lipopolysaccharide O1 antigen contributes to the virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing pyogenic liver abscess. *PLoS One.* 2012;7(3):e33155.
138. Lawlor MS, Handley SA, Miller VL. Comparison of the host responses to wild-type and *cpsB* mutant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Infect Immun.* 2006;74(9):5402-7.
139. Pan YJ, Lin TL, Chen CT, Chen YY, Hsieh PF, Hsu CR, et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Sci Rep.* 2015;5(1):15573.
140. Pan YJ, Fang HC, Yang HC, Lin TL, Hsieh PF, Tsai FC, et al. Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. *J Clin Microbiol.* 2008;46(7):2231-40.
141. Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C, et al. *wzi* Gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains. *J Clin Microbiol.* 2013;51(12):4073-8.
142. Gomez-Simmonds A, Greenman M, Sullivan SB, Tanner JP, Sowash MG, Whittier S, et al. Population structure of *Klebsiella pneumoniae* causing bloodstream infections at a New York city tertiary care hospital: diversification of multidrug-resistant isolates. *J Clin Microbiol.* 2015;53(7):2060-7.
143. Chuang YP, Fang CT, Lai SY, Chang SC, Wang JT. Genetic determinants of capsular serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. *J Infect Dis.* 2006;193(5):645-54.

144. Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem*. 2006;75(1):39-68.
145. Whitfield C, Roberts IS. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1999;31(5):1307-19.
146. Shu HY, Fung CP, Liu YM, Wu KM, Chen YT, Li LH, et al. Genetic diversity of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Microbiology (Reading)*. 2009;155(Pt 12):4170-83.
147. Pal S, Verma J, Mallick S, Rastogi SK, Kumar A, Ghosh AS. Absence of the glycosyltransferase WcaJ in *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 affects biofilm formation, increases polymyxin resistance and reduces murine macrophage activation. *Microbiology (Reading)*. 2019;165(8):891-904.
148. Devanga Ragupathi NK, Muthuirulandi Sethuvel DP, Triplicane Dwarakanathan H, Murugan D, Umashankar Y, Monk PN, et al. The influence of biofilms on carbapenem susceptibility and patient outcome in device associated *K. pneumoniae* Infections: insights into phenotype vs genome-wide analysis and correlation. *Front Microbiol*. 2020;11:591679.
149. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee HC, Ke DS, Lee CC, et al. Association between *rpmA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis*. 2006;42(10):1351-8.
150. Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J Exp Med*. 2004;199(5):697-705.
151. Yeh KM, Kurup A, Siu LK, Koh YL, Fung CP, Lin JC, et al. Capsular serotype K1 or K2, rather than *magA* and *rpmA*, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):466-71.
152. Young TM, Bray AS, Nagpal RK, Caudell DL, Yadav H, Zafar MA. Animal model to study *Klebsiella pneumoniae* gastrointestinal colonization and host-to-host transmission. *Infect Immun*. 2020;88(11):e00071-20.
153. Follador R, Heinz E, Wyres KL, Ellington MJ, Kowarik M, Holt KE, et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microb Genom*. 2016;2(8):e000073.
154. Heinz E, Brindle R, Morgan-McCalla A, Peters K, Thomson NR. Caribbean multi-centre study of *Klebsiella pneumoniae*: whole-genome sequencing, antimicrobial resistance and virulence factors. *Microb Genom*. 2019;5(5):e000266.
155. Ørskov I, Fife-Asbury MA. New *Klebsiella* capsular antigen, K82, and the deletion of five of those previously assigned. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1977;27(4):386-7.
156. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(3):e00001-19.
157. 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):1812-20.
158. Wyres KL, Wick RR, Judd LM, Froumine R, Tokolyi A, Gorrie CL, et al. Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS Genet*. 2019;15(4):e1008114.
159. Lee IR, Molton JS, Wyres KL, Gorrie C, Wong J, Hoh CH, et al. Differential host susceptibility and bacterial virulence factors driving *Klebsiella* liver abscess in an ethnically diverse population. *Sci Rep*. 2016;6(1):29316.
160. Tomás JM, Benedí VJ, Ciurana B, Jofre J. Role of capsule and O antigen in resistance of *Klebsiella pneumoniae* to serum bactericidal activity. *Infect Immun*. 1986;54(1):85-9.

161. Alvarez D, Merino S, Tomás JM, Benedí VJ, Albertí S. Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Infect Immun*. 2000;68(2):953-5.
162. Cortés G, Borrell N, de Astorza B, Gómez C, Sauleda J, Albertí S. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infect Immun*. 2002;70(5):2583-90.
163. Wick RR, Heinz E, Holt KE, Wyres KL. Kaptive web: user-friendly capsule and lipopolysaccharide serotype prediction for *Klebsiella* genomes. *J Clin Microbiol*. 2018;56(6):e00197-18.
164. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect Immun*. 2008;76(9):4055-65.
165. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infect Immun*. 2009;77(11):5016-24.
166. Stahlhut SG, Tchesnokova V, Struve C, Weissman SJ, Chattopadhyay S, Yakovenko O, et al. Comparative structure-function analysis of mannose-specific FimH adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2009;191(21):6592-601.
167. Gerlach GF, Clegg S, Allen BL. Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol*. 1989;171(3):1262-70.
168. Rosen DA, Pinkner JS, Walker JN, Elam JS, Jones JM, Hultgren SJ. Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH affect function and pathogenesis in the urinary tract. *Infect Immun*. 2008;76(7):3346-56.
169. Stahlhut SG, Struve C, Krogfelt KA, Reisner A. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;65(2):350-9.
170. Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol*. 2010;10(1):179.
171. Tarkkanen AM, Westerlund-Wikström B, Erkkilä L, Korhonen TK. Immunohistological localization of the MrkD adhesin in the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*. 1998;66(5):2356-61.
172. Allen BL, Gerlach GF, Clegg S. Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol*. 1991;173(2):916-20.
173. Sebghati TA, Korhonen TK, Hornick DB, Clegg S. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infect Immun*. 1998;66(6):2887-94.
174. Jagnow J, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology (Reading)*. 2003;149(Pt 9):2397-405.
175. Ramirez P, Bassi GL, Torres A. Measures to prevent nosocomial infections during mechanical ventilation. *Curr Opin Crit Care*. 2012;18(1):86-92.
176. Kollef MH. Prevention of hospital-associated pneumonia and ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med*. 2004;32(6):1396-405.
177. François P, Vaudaux P, Lew PD. Role of plasma and extracellular matrix proteins in the physiopathology of foreign body infections. *Ann Vasc Surg*. 1998;12(1):34-40.

178. Würker M, Beuth J, Ko HL, Mordarska A, Pulverer G. Type of fimbriation determines adherence of *Klebsiella* bacteria to human epithelial cells. *Zentralbl Bakteriol.* 1990;274(2):239-45.
179. Lam MM, Wick RR, Wyres KL, Gorrie CL, Judd LM, Jenney AW, et al. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. *Microb Genom.* 2018;4(9):e000196.
180. Russo TA, Olson R, MacDonald U, Beanan J, Davidson BA. Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* ex vivo and in vivo. *Infect Immun.* 2015;83(8):3325-33.
181. Russo TA, Olson R, Macdonald U, Metzger D, Maltese LM, Drake EJ, et al. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 2014;82(6):2356-67.
182. Fischbach MA, Lin H, Zhou L, Yu Y, Abergel RJ, Liu DR, et al. The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(44):16502-7.
183. Holden VI, Breen P, Houle S, Dozois CM, Bachman MA. *Klebsiella pneumoniae* siderophores induce inflammation, bacterial dissemination, and HIF-1 α stabilization during pneumonia. *mBio.* 2016;7(5):e01397-16.
184. Hancock V, Ferrières L, Klemm P. The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology (Reading).* 2008;154(Pt 1):167-75.
185. Lin TL, Lee CZ, Hsieh PF, Tsai SF, Wang JT. Characterization of integrative and conjugative element ICEKp1-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. *J Bacteriol.* 2008;190(2):515-26.
186. Lam MM, Wyres KL, Judd LM, Wick RR, Jenney A, Brisse S, et al. Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Genome Med.* 2018;10(1):77.
187. Nassif X, Fournier JM, Arondel J, Sansonetti PJ. Mucoid phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect Immun.* 1989;57(2):546-52.
188. 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.* 2006;313(5788):848-51.
189. Lai YC, Lin AC, Chiang MK, Dai YH, Hsu CC, Lu MC, et al. Genotoxic *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLoS One.* 2014;9(5):e96292.
190. Lu MC, Chen YT, Chiang MK, Wang YC, Hsiao PY, Huang YJ, et al. Colibactin contributes to the hypervirulence of *pks+* K1 CC23 *Klebsiella pneumoniae* in mouse meningitis infections. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:103.
191. Lam MM, Wyres KL, Duchêne S, Wick RR, Judd LM, Gan YH, et al. Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination. *Nat Commun.* 2018;9(1):2703.
192. Gona F, Comandatore F, Battaglia S, Piazza A, Trovato A, Lorenzin G, et al. Comparison of core-genome MLST, coreSNP and PFGE methods for *Klebsiella pneumoniae* cluster analysis. *Microb Genom.* 2020;6(4):e000347.
193. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4178-82.

194. Dekker JP, Frank KM. Next-generation epidemiology: using real-time core genome multilocus sequence typing to support infection control policy. *J Clin Microbiol*. 2016;54(12):2850-3.
195. Mellmann A, Bletz S, Böking T, Kipp F, Becker K, Schultes A, et al. Real-time genome sequencing of resistant bacteria provides precision infection control in an institutional setting. *J Clin Microbiol*. 2016;54(12):2874-81.
196. Tang P, Croxen MA, Hasan MR, Hsiao WW, Hoang LM. Infection control in the new age of genomic epidemiology. *Am J Infect Control*. 2017;45(2):170-9.
197. Reuter S, Ellington MJ, Cartwright EJ, Köser CU, Török ME, Gouliouris T, et al. Rapid bacterial whole-genome sequencing to enhance diagnostic and public health microbiology. *JAMA Intern Med*. 2013;173(15):1397-404.
198. Arlet G, Rouveau M, Casin I, Bouvet PJ, Lagrange PH, Philippon A. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 beta-lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. *J Clin Microbiol*. 1994;32(10):2553-8.
199. Smith CL, Cantor CR. Purification, specific fragmentation, and separation of large DNA molecules. *Methods Enzymol*. 1987;155:449-67.
200. 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.
201. Jeong SH, Kim HS, Kim JS, Shin DH, Kim HS, Park MJ, et al. Prevalence and molecular characteristics of carbapenemase-producing enterobacteriaceae from five hospitals in Korea. *Ann Lab Med*. 2016;36(6):52935.
202. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk Jm, Laurent F, et al.; ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill*. 2013;18(4):20380.
203. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebise R, Diancourt L, et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One*. 2009;4(3):e4982.
204. Breurec S, Guessennd N, Timinouni M, Le TA, Cao V, Ngandjio A, et al. *Klebsiella pneumoniae* resistant to third-generation cephalosporins in five African and two Vietnamese major towns: multiclonal population structure with two major international clonal groups, CG15 and CG258. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(4):349-55.
205. Wyres KL, Hawkey J, Hetland MA, Fostervold A, Wick RR, Judd LM, et al. Emergence and rapid global dissemination of CTX-M-15-associated *Klebsiella pneumoniae* strain ST307. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74(3):577-81.
206. David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, et al.; EuSCAPE Working Group; ESGEM Study Group. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol*. 2019;4(11):1919-29.
207. Nicoletti AG, Fehlberg LC, Picão RC, Machado AO, Gales AC. Clonal complex 258, the most frequently found multilocus sequence type complex in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(8):4563-4.
208. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, et al. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(7):3579-83.
209. Pereira PS, Borghi M, de Araújo CF, Aires CA, Oliveira JC, Asensi MD, et al. Clonal dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(8):4453-6.

210. Guimarães T, Nouér SA, Martins RC, Perdigão Neto LV, Martins WM, 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):e00528-19.
211. 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.
212. Wyres KL, Nguyen TN, Lam MM, Judd LM, van Vinh Chau N, Dance DA, et al. Genomic surveillance for hypervirulence and multi-drug resistance in invasive *Klebsiella pneumoniae* from South and Southeast Asia. *Genome Med*. 2020;12(1):11.
213. Dong N, Zhang R, Liu L, Li R, Lin D, Chan EW, et al. Genome analysis of clinical multilocus sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* from China. *Microb Genom*. 2018;4(2):e000149.
214. Dicker RC, Coronado F, Koo D, Parrish RG; Centers for Disease Control and Prevention. Principles of epidemiology in public health practice: an introduction to applied epidemiology and biostatistics. 3rd ed. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2006 [cited 2022 Mar 11]. Available from: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/6914>
215. Riley LW. Differentiating epidemic from endemic or sporadic infectious disease occurrence. *Microbiol Spectr*. 2019;7(4).
216. Snitkin ES, Won S, Pirani A, Lapp Z, Weinstein RA, Lolans K, et al. Integrated genomic and interfacility patient-transfer data reveal the transmission pathways of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a regional outbreak. *Sci Transl Med*. 2017;9(417):eaan0093.
217. Lawley TD, Clare S, Walker AW, Goulding D, Stabler RA, Croucher N, et al. Antibiotic treatment of clostridium difficile carrier mice triggers a supershedder state, spore-mediated transmission, and severe disease in immunocompromised hosts. *Infect Immun*. 2009;77(9):3661-9.
218. Chase-Topping M, Gally D, Low C, Matthews L, Woolhouse M. Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(12):904-12.
219. Lawley TD, Bouley DM, Hoy YE, Gerke C, Relman DA, Monack DM. Host transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is controlled by virulence factors and indigenous intestinal microbiota. *Infect Immun*. 2008;76(1):403-16.
220. Wu D, Cai J, Liu J. Risk factors for the acquisition of nosocomial infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *South Med J*. 2011;104(2):106-10.
221. Jiao Y, Qin Y, Liu J, Li Q, Dong Y, Shang Y, et al. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection/colonization and predictors of mortality: a retrospective study. *Pathog Glob Health*. 2015;109(2):68-74.
222. Lerner A, Adler A, Abu-Hanna J, Percia S, Matalon M, Carmeli Y. Spread of KPC-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the importance of super-spreaders and rectal KPC concentration. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(5):470.e1-7.
223. Rao K, Patel A, Sun Y, Vornhagen J, Motyka J, Collingwood A, Teodorescu A, Baang JH, Zhao L, Kaye KS, Bachman MA. Risk factors for *Klebsiella* infections among hospitalized patients with preexisting colonization. *mSphere*. 2021;6(3):e0013221.
224. Cano A, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, Gracia-Ahufinger I, Pérez-Nadales E, Causse M, et al. Risks of infection and mortality among patients colonized with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: validation of scores and proposal for management. *Clin Infect Dis*. 2018;66(8):1204-10.
225. Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al. Intestinal

domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2012;55(7):905-14.

226. Lee IA, Kim DH. *Klebsiella pneumoniae* increases the risk of inflammation and colitis in a murine model of intestinal bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2011;46(6):684-93.

227. Zhou W, Cao Q, Peng Y, Zhang QJ, Castrillon DH, DePinho RA, et al. FoxO4 inhibits NF- κ B and protects mice against colonic injury and inflammation. *Gastroenterology*. 2009;137(4):1403-14.

228. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000;18(1):621-63.

229. Marcinkiewicz J, Ciszek M, Bobek M, Strus M, Heczko PB, Kurnyta M, et al. Differential inflammatory mediator response in vitro from murine macrophages to lactobacilli and pathogenic intestinal bacteria. *Int J Exp Pathol*. 2007;88(3):155-64.

230. Ramos-Ramos JC, Lázaro-Perona F, Arribas JR, García-Rodríguez J, Mingorance J, Ruiz-Carrascoso G, et al. Proof-of-concept trial of the combination of lactitol with *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* for the eradication of intestinal OXA-48-producing *Enterobacteriaceae*. *Gut Pathog*. 2020;12(1):15.

231. Piewngam P, Zheng Y, Nguyen TH, Dickey SW, Joo HS, Villaruz AE, et al. Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference. *Nature*. 2018;562(7728):532-7.

232. Soria Segarra C, Larrea Vera G, Berrezueta Jara M, Arévalo Mendez M, Cujilema P, Serrano Lino M, et al. Utility of CHROMagar mSuperCARBA for surveillance cultures of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *New Microbes New Infect*. 2018;26:42-8.

233. Centers for Disease Control and Prevention. Multiplex real-time PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) and New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1) genes; 2011 [cited 2022 Mar 11]. Available from: <https://www.cdc.gov/hai/settings/lab/kpc-ndm1-lab-protocol.html>

234. Salvà-Serra F, Gomila M, Svensson-Stadler L, Busquets A, Jaén-Luchoro D, Karlsson R, et al. A protocol for extraction and purification of high-quality and quantity bacterial DNA applicable for genome sequencing: a modified version of the Marmur procedure (Version 1). *Protoc Exch*. London: Nature; 2018 [cited 2022 Mar 11]. Available from: <https://protocolexchange.researchsquare.com/article/nprot-6915/v1>

235. Elbir H, Feil EJ, Drancourt M, Roux V, El Sanousi SM, Eshag M, et al. Ovine clone ST1464: a predominant genotype of *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* isolated from sheep in Sudan. *J Infect Dev Ctries*. 2010;4(4):235-8.

236. 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:D325-8.

237. Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, et al. Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(11):e00483-19.

238. Lerner A, Romano J, Chmelnitsky I, Navon-Venezia S, Edgar R, Carmeli Y. Rectal swabs are suitable for quantifying the carriage load of KPC-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(3):1474-9.

239. Stoesser N, Phan HT, Seale AC, Aiken Z, Thomas S, Smith M, et al.; TRACE Investigators' Group. Genomic Epidemiology of Complex, Multispecies, Plasmid-Borne bla KPC Carbapenemase in *Enterobacterales* in the United Kingdom from 2009 to 2014. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(5):e02244-19.

240. Hamzaoui Z, Ocampo-Sosa A, Fernandez Martinez M, Landolsi S, Ferjani S, Maamar E, et al. Role of association of OmpK35 and OmpK36 alteration and blaESBL and/or blaAmpC genes

in conferring carbapenem resistance among non-carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;52(6):898-905.

241. Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, et al. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(4):1485-93.

242. Perez F, Pultz MJ, Endimiani A, Bonomo RA, Donskey CJ. Effect of antibiotic treatment on establishment and elimination of intestinal colonization by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(6):2585-9.

243. Moranta D, Regueiro V, March C, Llobet E, Margareto J, Larrarte E, et al. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of beta-defensins by airway epithelial cells. *Infect Immun*. 2010;78(3):1135-46.

244. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):664-89.

245. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev*. 1993;57(1):138-63.

246. Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Chen L, Kreiswirth BN, Clancy CJ. In Vitro selection of meropenem resistance among ceftazidime-avibactam-resistant, meropenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* isolates with variant KPC-3 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(5):e00079-17.

247. Giddins MJ, Macesic N, Annavajhala MK, Stump S, Khan S, McConville TH, et al. Successive emergence of ceftazidime-avibactam resistance through distinct genomic adaptations in blaKPC-2-harboring *Klebsiella pneumoniae* sequence type 307 isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(3):e02101-17.

248. Stillwell T, Green M, Barbadora K, Ferrelli JG, Roberts TL, Weissman SJ, et al. Outbreak of KPC-3 producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a US pediatric hospital. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2015;4(4):330-8.

249. Tang Y, Shen P, Liang W, Jin J, Jiang X. A putative multi-replicon plasmid co-harboring beta-lactamase genes blaKPC-2, blaCTX-M-14 and blaTEM-1 and trimethoprim resistance gene dfrA25 from a *Klebsiella pneumoniae* sequence type (ST) 11 strain in China. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171339.

250. Bartolleti F, Seco BM, Capuzzo Dos Santos C, Felipe CB, Lemo ME, Alves TS, et al. Polymyxin B resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(10):1849-51.

251. Rodrigues AC, Chang MR, Santos IC, Assef AP. Molecular epidemiology of blaKPC-encoding *Klebsiella pneumoniae* isolated from public hospitals in Midwest of Brazil. *Microb Drug Resist*. 2022;28(1):1-6.

252. Gaspar GG, Bellissimo-Rodrigues F, Andrade LN, Darini AL, Martinez R. Induction and nosocomial dissemination of carbapenem and polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(4):483-7.

253. Lee AH, Porto WF, de Faria C Jr, 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 Genom*. 2021;7(8):000613.

254. Paño-Pardo JR, López Quintana B, Lázaro Perona F, Ruiz Carrascoso G, Romero-Gómez MP, Loeches Yagüe B, et al. Community-onset bloodstream and other infections, caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: epidemiological, microbiological, and clinical features. *Open Forum Infect Dis*. 2016;3(3):ofw136.

255. van Loon K, Voor In 't Holt AF, Vos MC. A systematic review and meta-analyses of the

clinical epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;62(1):e01730-17.

256. 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.

257. Kinashi Y, Hase K. Partners in leaky gut syndrome: intestinal dysbiosis and autoimmunity. *Front Immunol.* 2021;12:673708.

258. Gagliotti C, Giordani S, Ciccarese V, Barozzi A, Giovinnazzi A, Pietrantonio AM, et al. Risk factors for colonization with carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospital: a matched case-control study. *Am J Infect Control.* 2014;42(9):1006-8.

259. Schlee M, Harder J, Köten B, Stange EF, Wehkamp J, Fellermann K. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. *Clin Exp Immunol.* 2008;151(3):528-35.

260. Kotzampassi K, Bourboulis EJ, Voudouris A, Kazamias P, Eleftheriadis E. Benefits of a synbiotic formula (Synbiotic 2000Forte) in critically ill trauma patients: early results of a randomized controlled trial. *World J Surg.* 2006;30(10):1848-55.

261. Tiwana H, Natt RS, Benitez-Brito R, Shah S, Wilson C, Bridger S, et al. Correlation between the immune responses to collagens type I, III, IV and V and *Klebsiella pneumoniae* in patients with Crohn's disease and ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford).* 2001;40(1):15-23.

262. Ebringer A, Rashid T, Tiwana H, Wilson C. A possible link between Crohn's disease and ankylosing spondylitis via *Klebsiella* infections. *Clin Rheumatol.* 2007;26(3):289-97.

263. Joseph L, Merciecca T, Forestier C, Balestrino D, Miquel S. From *Klebsiella pneumoniae* colonization to dissemination: an overview of studies implementing murine models. *Microorganisms.* 2021;9(6):1282.

264. Kaur CP, Vadivelu J, Chandramathi S. Impact of *Klebsiella pneumoniae* in lower gastrointestinal tract diseases. *J Dig Dis.* 2018;19(5):262-71.

265. Drakoularakou A, Hasselwander O, Ouwehand A. Lactitol, an emerging prebiotic: functional properties with a focus on digestive health. *Food Sci Technol Bull.* 2007;3(7):71-80.

Abstract

Introduction: Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections are difficult to treat. The spread of multidrug-resistant and hypervirulent strains cause an impact on mortality rates. Intestinal colonization by Carbapenem-Resistant Enterobacteria contributes to the spread of these bacteria in the environment as well as to the development of infections. So far, mechanisms involved in the progression of colonization to infections are not well understood. **Purpose:** To evaluate the association between virulence and resistance with the endemicity of *Klebsiella pneumoniae* carrying *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase and, along with the density of intestinal colonization by Carbapenem-Resistant Enterobacteria, to evaluate the association of these factors with the risk for the development of infections subsequent to colonization. **Methods:** *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-carrying and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients admitted to a tertiary hospital in Sao Paulo between 2011 and 2021 were evaluated. The identification of the endemic population was performed by Pulsed Field Gel Electrophoresis and Multilocus Sequence Typing, and the evaluation of virulence, resistance, capsular type and plasmid mechanisms was performed through genome analysis. The colonization density by ERC and by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-carrying bacteria was evaluated using microbiological and molecular quantification methods, respectively. **Results:** The infection isolates showed high rates of resistance to cephalosporins, fluoroquinolones and aminoglycosides, as well as to carried genetic determinants related to resistance to these classes of antibiotics. Endemic isolates were generally involved in the episodes of infections subsequent to colonization when compared with sporadic isolates. Although important virulence mechanisms such as *ICEKp* and *manBC* were found, they alone did not explain the progression from colonization to infection. In contrast, the increase in the relative intestinal load of Carbapenem-Resistant Enterobacteria and/or *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria were significantly associated with the development of subsequent infections in the set of patients evaluated. **Conclusions:** The endemic population of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-carrying *Klebsiella pneumoniae*, as determined by pulsed field gel electrophoresis and multilocus sequence typing profiles, were multidrug-resistant and they were often found in episodes of infections subsequent to intestinal colonization compared with sporadic isolates. The density of intestinal

colonization played an important role in the development of infections. Given the difficulty in treating infections caused by multidrug-resistant bacteria to recognize the bacterial population circulating in an environment, identify and interrupt its transmission routes, as well as to act on intestinal colonization as an attempt to reduce the density of colonization by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-carrying *Klebsiella pneumoniae* may be important approaches to prevent the development of difficult-to-treat infections.

Keywords: Bacterial load; *Klebsiella pneumoniae*; Beta-lactamases; Whole genome sequencing

Apêndices

Apêndice 1. Lista dos 176 isolados de *Klebsiella pneumoniae* carreadoras de *bla*_{KPC} avaliadas neste estudo

ID	Paciente	Data	ST	Espécime clínica	FG (PFGE)	End_Esp	CAZ	CEF	AMI	GEN	CIP	IMI	MER
KP866	41	Ago-20	-	Swab retal	1	0	R	R	S	S	R	R	R
KP888*	41	Ago-20	11	Secreção traqueal	1A	0	R	R	S	S	R	R	R
KP880	42	Nov-20	-	Swab retal	2	0						R	R
KP890*	42	Nov-20	11	Secreção traqueal	2A	0						R	R
KP873	43	Out-20	-	Swab retal	3	0	R	R	R	R	R	R	R
KP889*	43	Out-20	11	Sangue	3	0	R	R	S	S	R	R	R
KP896	123	Dez-20	11	Swab retal	3A	0						R	R
KP903	98	Jul-18	11	Swab retal	4	0						R	R
KP801	102	Ago-20	11	Swab retal	5	0	R	R	S	S	R	R	R
KP904	99	Nov-18	11	Swab retal	6	0	S	S	R	R	R	R	R
KP497*	96	Jul-14	15	Swab retal	7	0	R	R	R	R	R	R	R
KP738	45	Jul-20	437	Swab retal	8	0						R	R
KP865	44	Jul-20	-	Swab retal	9	0	S	S	R	R	R	R	R
KP887*	44	Jul-20	437	Secreção traqueal	9	0	R	R	S	S	R	R	R
KP376	97	Mar-15	11	Swab retal	10	0	R	R	R	R	R	R	R
KP728	104	Ago-20	437	Swab retal	11	0	S	S	R	R	R	R	R
KP737	103	Jul-20	11	Swab retal	11A	0						R	R
KP378	10	Jan-16	11	Swab retal	12	0						R	R
KP391*	10	Jan-16	11	Abcesso abdominal	12A	0						R	R
KP148	20	Fev-12	-	Swab retal	13	1						R	R
KP149*	20	Fev-12	437	Secreção traqueal	13	1	R	R	R	R	R	R	R
KP886*	54	Jul-20	512	Secreção traqueal	13A	1	R	R	R	S	R	R	R

continua...

...continuação

KP177*	21	Maio-13	437	Sangue	14	0						R	R
KP178	21	Maio-13	-	Secreção traqueal	14	0						R	R
KP508	92	Jul-15	437	Swab retal	15	0	R	R	S	S	R	R	R
KP882	108	Nov-20	11	Swab retal	16	0						R	R
KP288	11	Jun-16	-	Swab retal	17	1						R	R
KP289*	11	Jun-16	11	Secreção traqueal	17	1						R	R
KP387*	51	Jun-13	11	Líquido ascítico	17A	1						R	R
KP601*	12	Jul-17	11	Urina	18	0						R	R
KP602	12	Jul-17	-	Swab retal	18	0						R	R
KP609	47	Fev-14	-	Swab retal	18	0						R	R
KP377	66	Jul-15	11	Swab retal	19	1						R	R
KP380	67	Set-16	11	Swab retal	19	1						R	R
KP884	110	Nov-20	11	Swab retal	19A	1						R	R
KP458	68	Fev-16	11	Swab retal	20	1	R	R	R	R	R	R	R
KP478	69	Fev-16	11	Swab retal	20	1	R	R	R	R	R	R	R
KP588	70	Maio-16	11	Swab retal	20	1	R	R	S	S	R	R	R
KP382	71	Jul-17	11	Swab retal	20A	1						R	R
KP594	72	Set-16	11	Swab retal	20B	1	S	S	S	S	R	R	R
KP881	109	Nov-20	11	Swab retal	20C	1	R	R	R	R	R	R	R
KP590	73	Jul-16	11	Swab retal	21	0	R	R	S	S	R	R	R
KP872	38	Dez-20	-	Swab retal	22	0	R	R	S	S	R	R	R
KP872*	38	Dez-20	11	Secreção traqueal	22	0						R	R
KP555	94	Maio-17	11	Swab retal	23	0						R	R
KP374	86	Out-13	437	Swab retal	24	1						R	R
KP375	87	Jul-14	437	Swab retal	24	1						R	R
KP437	88	Fev-16	11	Swab retal	25	0						R	R
KP574	74	Out-14	437	Swab retal	26	1						R	R

continua...

...continuação

KP576	75	Out-14	437	Swab retal	26	1						R	R
KP606	76	Out-13	437	Swab retal	26	1						R	R
KP529	77	Jul-14	437	Swab retal	26A	1						R	R
KP577	78	Out-14	437	Swab retal	26A	1						R	R
KP578	79	Out-14	437	Swab retal	26A	1						R	R
KP579	80	Out-14	437	Swab retal	26A	1	R	R	S	S	R	R	R
KP607	82	Nov-13	437	Swab retal	26A	1						R	R
KP605	81	Jul-13	15	Swab retal	27	0						R	R
KP440	83	Ago-16	437	Swab retal	28	1	R	R	S	S	R	R	R
KP540	84	Maio-17	437	Swab retal	28A	1						R	R
KP447	52	Jun-14	-	Swab retal	29	1						R	R
KP545	85	Fev-16	437	Swab retal	29	1						R	R
KP179	13	Jul-13	-	Swab retal	29A	1						R	R
KP180*	13	Ago-13	437	Urina	29A	1						R	R
KP564*	14	Ago-14	437	Secreção traqueal	30	0						R	R
KP569	14	Ago-14	-	Swab retal	30	0	R	R	S	S	R	R	R
KP439	15	Jul-14	-	Swab retal	30A	0						R	R
KP516*	15	Jul-14	437	Secreção traqueal	30A	0						R	R
KP123	16	Ago-14	-	Swab retal	31	0	R	R	S	S	R	R	R
KP457	17	Jul-14	-	Swab retal	31	0	R	R	R	R	R	R	R
KP527*	17	Jul-14	437	Secreção traqueal	31	0						R	R
KP124*	16	Ago-14	437	Urina	31A	0	R	R	R	R	R	R	R
KP906*	32	Maio-18	437	Secreção traqueal	32	0	R	R	S	S	R	R	R
KP907	32	Maio-18	-	Swab retal	32	0						R	R
KP908*	33	Maio-18	437	Lavado Broncoalveolar	32	0	R	R	R	R	R	R	R
KP909	33	Maio-18	-	Swab retal	32	0	R	R	S	S	R	R	R

continua...

...continuação

KP582	90	Ago-15	437	Swab retal	33	0						R	R
KP396*	19	Fev-12	11	Urina	34	0						R	R
KP405	19	Fev-12	-	Swab retal	35	0	R	R	S	S	R	R	R
KP384*	18	Mar-14	437	Sangue	36	1						R	R
KP385	18	Mar-14	-	Secreção traqueal	36	1						R	R
KP388	51	Jun-13	-	Swab retal	36A	1						R	R
KP379	91	Jul-16	437	Swab retal	36B	1	R	R	S	S	R	R	R
KP525*	52	Jul-14	437	Urina	37	1	R	R	R	R	R	R	R
KP597	89	Out-16	437	Swab retal	37A	1	R	R	R	S	R	R	R
KP420	64	Ago-16	-	Swab retal	68	0						R	R
KP599	65	Jun-17	11	Swab retal	69	0						R	R
KP878	39	Fev-21	-	Swab retal	38	0						R	R
KP878*	39	Fev-21	11	Secreção traqueal	38	0						R	R
KP495	63	Jul-17	340	Swab retal	39	0						R	R
KP869	115	Set-20	437	Swab retal	40	0						R	R
KP910*	34	Dez-18	11	Sangue	41	1						R	R
KP911	34	Dez-18	-	Swab retal	41	1						R	R
KP874	118	Out-20	11	Swab retal	41A	1						R	R
KP875	119	Out-20	11	Swab retal	41A	1						R	R
KP107*	9	Out-15	11	Sangue	42	0						R	R
KP583	9	Out-15	-	Swab retal	42	0						R	R
KP503*	50	Jul-15	340	Secreção traqueal	43	1						R	R
KP876	116	Nov-20	437	Swab retal	43A	1						R	R
KP916	35	Nov-19	-	Swab retal	44	1	R	R	S	S	R	R	R
KP912*	35	Nov-19	11	Secreção traqueal	44	1						R	R
KP511	62	Jul-14	437	Swab retal	44A	1						R	R
KP738*	45	Ago-20	-	Secreção traqueal	45	0						R	R

continua...

...continuação

KP877	113	Nov-20	11	Swab retal	45A	0							R	R
KP870	37	Set-20	-	Swab retal	46	0							R	R
KP870*	37	Out-20	11	Urina	46	0	R	R	R	R	R	R	R	R
KP879	114	Nov-20	11	Swab retal	46A	0	R	R	S	S	R	R	R	R
KP871	111	Out-20	11	Swab retal	47	0							R	R
KP863	117	Ago-20	11	Swab retal	48	0	R	R	R	R	R	R	R	R
KP247	26	Ago-11	-	Swab retal	49	0							R	R
KP546*	26	Ago-11	11	Secreção traqueal	50	0							R	R
KP411	24	Fev-16	-	Swab retal	51	0							R	R
KP456*	24	Fev-16	437	Secreção traqueal	51	0							R	R
KP481	50	Ago-15	437	Swab retal	52	0	R	R	R	R	R	R	R	R
KP381	93	Abr-17	437	Swab retal	53	0	R	R	R	R	R	R	R	R
KP328	25	Fev-15	-	Swab retal	54	0							R	R
KP329*	25	Fev-15	11	Lavado Broncoalveolar	54	0							R	R
KP898	107	Jan-21	307	Swab retal	55	0							R	R
KP864	54	Jul-20	443	Swab retal	56	0	R	R	R	R	R	R	R	R
KP867	120	Set-20	307	Swab retal	57	0	R	R	S	S	R	R	R	R
KP515*	2	Ago-15	16	Urina	58	1							R	R
KP581	2	Ago-15	-	Swab retal	58	1							R	R
KP490	3	Jul-14	-	Swab retal	58A	1							R	R
KP568*	3	Jul-14	16	Abcesso abdominal	58A	1							R	R
KP862	122	Ago-20	16	Swab retal	59	0							R	R
KP885	40	Dez-20	-	Swab retal	60	0							R	R
KP885*	40	Jan-21	16	Secreção traqueal	60A	0							R	R
KP72*	53	Jul-16	16	Sangue	61	0							R	R
KP326*	4	Jun-16	16	Sangue	62	0							R	R

continua...

...continuação

KP327	4	Jun-16	-	Swab retal	62	0						R	R
KP596	61	Out-16	16	Swab retal	62A	0	R	R	S	S	R	R	R
KP286	5	Maio-17	-	Swab retal	63	0						R	R
KP600*	5	Jun-17	16	Abcesso abdominal	63	0						R	R
KP428	56	Ago-16	16	Swab retal	64	0	R	R	S	S	R	R	R
KP902	121	Fev-21	16	Swab retal	65	0						R	R
KP415*	57	Ago-16	16	Swab retal	66	0						R	R
KP589	58	Jul-16	16	Swab retal	66A	0						R	R
KP416	22	Ago-11	-	Swab retal	67	0						R	R
KP462*	22	Ago-11	437	Urina	67	0						R	R
KP389*	23	Set-13	437	Lavado Broncoalveolar	70	0						R	R
KP390	23	Set-13	-	Secreção traqueal	70	0	R	R	S	S	R	R	R
KP584	59	Fev-16	16	Swab retal	71	0						R	R
KP586	60	Maio-16	16	Swab retal	71	0						R	R
KP146	49	Jul-14	-	Swab retal	72	0						R	R
KP121*	6	Mar-14	437	Sangue	73	1						R	R
KP122	6	Fev-14	-	Swab retal	73	1						R	R
KP226	7	Set-11	-	Swab retal	73	1						R	R
KP90*	8	Jan-15	437	Sangue	73	1						R	R
KP91*	8	Jan-15	-	Secreção traqueal	73	1	R	R	R	R	R	R	R
KP225*	7	Out-11	437	Sangue	73A	1	R	R	S	S	R	R	R
KP914*	36	Out-19	443	Secreção traqueal	74	0	R	R	R	R	R	R	R
KP915	36	Out-19	-	Swab retal	74	0	R	R	R	R	R	R	R
KP901	112	Jan-20	16	Swab retal	75	0	R	R	R	R	R	R	R
KP883	46	Nov-20	-	Swab retal	76	1	R	R	R	R	R	R	R
KP891*	46	Nov-20	101	Secreção traqueal	76	1	R	R	S	S	S	R	R
KP905	100	Nov-19	101	Swab retal	76A	1						R	R

continua...

...continuação

KP580	95	Jul-15	15	Swab retal	77	0						R	R
KP868	105	Set-20	13	Swab retal	78	0						R	R
KP210*	1	Jul-13	340	Secreção traqueal	79	0						R	R
KP211	1	Jul-13	-	Secreção traqueal	79	0	R	R	S	S	R	R	R
KP610*	47	Fev-14	11	Secreção traqueal	80	0						R	R
KP899	106	Jan-21	11	Swab retal	81	0						R	R
KP604*	48	Mar-13	15	Líquido ascítico	82	0						R	R
KP897	124	Dez-20	323	Swab retal	83	0						R	R
KP140*	49	Jul-14	-	Urina	84	0						R	R
KP373	48	Mar-13	11	Swab retal	85	0	R	R	R	R	R	R	R
KP552	28	Jun-14	-	Swab retal	86	0						R	R
KP567*	28	Jun-14	15	Secreção traqueal	86A	0	R	R	R	R	R	R	R
KP553	27	Fev-16	-	Swab retal	87	0						R	R
KP78*	27	Fev-16	11	Urina	87	0	R	R	R	R	R	R	R
KP414	31	Ago-16	-	Swab retal	88	0	R	R	R	R	R	R	R
KP592*	31	Ago-16	11	Urina	88	0						R	R
KP494	29	Ago-17	-	Swab retal	89	0	R	R	R	R	R	R	R
KP522	30	Ago-17	-	Swab retal	89	0	R	R	S	S	R	R	R
KP531*	30	Ago-17	11	Secreção traqueal	89	0						R	R
KP530*	29	Ago-17	11	Urina	89A	0						R	R

ID: identificação do isolado; ST: *sequence type*; FG: filogrupo classificado de acordo com o padrão de PFGE; End_Esp: classificação dos isolados como Endêmicos (0) ou Esporádicos (1) CZ: Ceftazidima; CF: Cefepime; AM: Amicacina; GE: Gentamicina; CI : Ciprofloxacina; IM: Imipenem; ME: Meropenem; R: Resistente; S: Sensível. Períodos de maior incidência de ERC no HIAE destacados em roxo; isolados endêmicos destacados em vermelho; Col/Inf: cepas relacionadas com a infecção. Ambas as cepas de colonização e infecção do mesmo paciente estão descritas na tabela e podem ser identificadas pela identificação do paciente através número; Só col: isolados de pacientes que só apresentaram a colonização sem episódios de infecção subsequente.

Apêndice 2. Dados referentes aos genomas dos isolados de *Klebsiella pneumoniae*

ID	Espécime clínica	Data	PFGE Cluster	MLST	Tipo CPS	Ag O	Cobertura	CG(%)	Contigs	Tamanho do genoma	Número de acesso
KP107	Sangue	Outubro-15	42	11	KL64	O2	100	57,02	281	5880573	JAMBER000000000
KP121	Sangue	Março-2014	73	437	KL36	O4	84	57,3	55	5540427	JAEVGO000000000
KP124	Urina	Agosto-2014	31A	437	KL36	O4	74,2	57,3	327	5590889	JAMBES000000000
KP149	Secreção Traqueal	Fevereiro-2012	13	437	KL36	O4	72	57,26	324	5624184	JAMBET000000000
KP177	Sangue	Maio-2013	14	437	KL36	O4	83	57,3	79	5588595	JAEVGN000000000
KP180	Urina	Agosto-2013	29A	437	KL36	O4	57,6	57,26	324	5567753	JAMBEU000000000
KP210	Secreção Traqueal	Julho-2013	79	340	KL15	O4	152	57,1	246	5664817	JAMBEV000000000
KP225	Sangue	Outubro-2011	73A	437	KL36	O4	64	57,1	81	5777432	JAEVGM000000000
KP289	Secreção Traqueal	Junho-2016	17	11	KL15	O4	62,7	57,31	251	5545482	JAMBEW000000000
KP326	Sangue	Junho-2016	62	16	KL51	O3b	91	57,2	73	5568506	JAEVGL000000000
KP329	Lavado Broncoalveolar	Fevereiro-2015	54	11	KL64	O2	66	57,1	126	5887447	JAEVGK000000000
KP373	Swab retal	Março-2013	85	11	KL64	O2	81	57	66	5900023	JAEVGG000000000
KP374	Swab retal	Outubro-2013	24	437	KL36	O4	84	57,3	78	5604442	JAEVGF000000000
KP375	Swab retal	Julho-2014	24	437	KL36	O4	65,6	57,25	261	5579926	JAMBEX000000000
KP376	Swab retal	Março-2015	10	11	KL27	unknown	82	56,6	135	6162587	JAEVGE000000000
KP377	Swab retal	Julho-2015	19	11	KL64	O2	91	56,8	115	5808417	JAEVGD000000000
KP378	Swab retal	Janeiro-2016	12	11	KL64	O2	87	56,9	62	5872332	JAEVGC000000000
KP379	Swab retal	Julho-2016	36B	437	KL36	O4	81,2	57,17	242	5629368	JAMBEY000000000
KP380	Swab retal	Setembro-2016	19	11	KL64	O2	82	57,8	219	5828327	JAMBEZ000000000
KP381	Swab retal	Abril-2017	53	437	KL36	O4	78	56,5	128	6095298	JAEVGB000000000
KP382	Swab retal	Julho-2017	20A	11	KL64	O2	94	56,9	97	5877886	JAEVGA000000000
KP384	Sangue	Março-2014	36	437	KL36	O4	66	57,3	76	5569047	JAEVGJ000000000

continua...

...continuação

KP387	Líquido Ascítico	Junho-2013	17A	11	KL27	O2	51	57	104	5852833	JAEVGI000000000
KP389	Lavado Broncoalveolar	Setembro-2013	70	437	KL36	O4	88	57,3	73	5473833	JAEVGH000000000
KP391	Abcesso abdominal	Janeiro-2016	12A	11	KL64	O2	77	56,9	67	5871659	JACBOQ000000000
KP396	Urina	Fevereiro-2012	34	11	KL27	O2	149	56,97	278	5910989	JAMBFA000000000
KP415	Swab retal	Agosto-2016	66	16	KL51	O3b	161	57,06	196	5708549	JAMBFB000000000
KP428	Swab retal	Agosto-2016	64	16	KL51	O3b	182	57,25	239	5578954	JAMBFC000000000
KP437	Swab retal	Fevereiro-2016	25	11	KL27	O1	102	56,9	218	5899913	JAMBFD000000000
KP440	Swab retal	Agosto-2016	28	437	KL36	O4	74,7	57,33	356	5555397	JAMBFE000000000
KP456	Secreção Traqueal	Fevereiro-2016		437	KL36	O4	55	57,3	320	5589926	JAMBFF000000000
KP458	Swab retal	Fevereiro-2016	20	11	KL64	O2	74	57,08	235	5837905	JAMBFG000000000
KP462	Urina	Agosto-2011	67	437	KL36	O4	85	57,32	321	5563220	JAMBFH000000000
KP478	Swab retal	Fevereiro-2016	20	11	KL64	O2	118	57,07	216	5839052	JAMBFI000000000
KP481	Swab retal	Agosto-2015	52	437	KL36	O4	57,7	57,3	260	5546630	JAMBFJ000000000
KP495	Swab retal	Julho-2017	39	340	KL15	O4	144	57,4	185	5354197	JAMBFK000000000
KP497	Swab retal	Julho-2014	7	15	KL24	O1	109	57,3	186	5460992	JAMBFL000000000
KP503	Secreção Traqueal	Julho-2015	43	340	KL15	O4	54,5	57,1	262	5766713	JAMBFM000000000
KP508	Swab retal	Julho-2015	15	437	KL36	O4	130	57,33	197	5376418	JAMBFN000000000
KP511	Swab retal	Julho-2014	44A	437	KL36	O4	125	57,4	182	5455386	JAMBFO000000000
KP515	Urina	Agosto-2015	58	16	KL51	O3b	38,6	56,89	743	5808571	JAMBFP000000000
KP516	Secreção Traqueal	Julho-2014	30A	437	KL36	O4	80	57,12	462	5726889	JAMBFQ000000000
KP525	Urina	Julho-2014	37	437	KL36	O4	53,9	57,36	265	5498416	JAMBFR000000000
KP527	Secreção Traqueal	Julho-2014	31	437	KL36	O4	89,4	57,43	347	5422738	JAMBFS000000000
KP529	Swab retal	Julho-2014	26A	437	KL36	O4	61,2	57,48	257	5370432	JAMBFT000000000
KP530	Urina	Agosto-2017	89A	11	KL15	O4	121	57,29	219	5546566	JAMBFU000000000
KP531	Secreção Traqueal	Agosto-2017	89	11	KL15	O4	23	57,29	441	5569565	JAMBFV000000000

continua...

...continuação

KP540	Swab retal	Maio-2017	28A	437	KL36	O4	417	57,44	188	5373410	JAMBFW000000000
KP545	Swab retal	Fevereiro-2016	29	437	KL36	O4	76,9	57,3	269	5536463	JAMBFX000000000
KP546	Secreção Traqueal	Agosto-2011	50	11	KL27	O2	166	57,16	350	5737006	JAMBFY000000000
KP555	Swab retal	Maio-2017	23	11	KL64	O2	148	56,51	453	6215171	JAMBFZ000000000
KP564	Secreção Traqueal	Agosto-2014	30	437	KL36	O4	147	57,46	258	5354688	JAMBGA000000000
KP567	Secreção Traqueal	Junho-2014	86A	15	KL24	O1	89,2	57,25	241	5386809	JAMBGB000000000
KP568	<i>Abcesso abdominal</i>	Julho-2014	58A	16	KL51	O3b	58	56,65	354	5965890	JAMBGC000000000
KP574	Swab retal	Outubro-2014	26	437	KL36	O4	137	57,31	223	5573224	JAMBGD000000000
KP576	Swab retal	Outubro-2014	26	437	KL36	O4	172	57,3	261	5580286	JAMBGE000000000
KP577	Swab retal	Outubro-2014	26A	437	KL36	O4	116	57,31	219	5568665	JAMBGF000000000
KP578	Swab retal	Outubro-2014	26A	437	KL36	O4	155	57,31	193	5562632	JAMBGG000000000
KP579	Swab retal	Outubro-2014	26A	437	KL36	O4	131	57,31	263	5573661	JAMBGH000000000
KP580	Swab retal	Julho-2015	77	15	KL112	O1	164	57,13	198	5608578	JAMBGJ000000000
KP582	Swab retal	Agosto-2015	33	437	KL36	O4	130	57,26	274	5603102	JAMBGJ000000000
KP584	Swab retal	Fevereiro-2016	71	16	KL51	O3b	192	57,16	252	5695134	JAMBGK000000000
KP586	Swab retal	Maio-2016	71	16	KL51	O3b	139	57,19	238	5645673	JAMBGL000000000
KP588	Swab retal	Maio-2016	20	11	KL64	O2	122	57,03	222	5884071	JAMBGM000000000
KP589	Swab retal	Julho-2016	66A	16	KL51	O3b	183	57,4	107	5421422	JAMBGN000000000
KP590	Swab retal	Julho-2016	21	11	KL64	O2	179	57,05	243	5794562	JAMBGO000000000
KP592	Urina	Agosto-2016	88	11	KL64	O2	110	57,02	251	5881346	JAMBGP000000000
KP594	Swab retal	Setembro-2016	20B	11	KL64	O2	166	57,04	219	5862547	JAMBGQ000000000
KP596	Swab retal	Outubro-2016	62A	16	KL51	O3b	216	57,17	183	5597170	JAMBGR000000000
KP597	Swab retal	Outubro-2016	37A	437	KL36	O4	134	57,17	175	5560047	JAMBGS000000000
KP599	Swab retal	Junho-2017	69	11	KL15	O4	170	57,29	175	5535909	JAMBGT000000000
KP600	<i>Abcesso Abdominal</i>	Junho-2017	63	16	KL51	O3b	132	57,16	438	5699725	JAMBGU000000000
KP601	Urina	Julho-2017	18	11	KL64	O2	103	56,74	262	5804179	JAMBGV000000000
KP604	Ascitic fluid	Março-2013	82	15	KL112	O1	136	57,13	312	5585486	JAMBGW000000000

continua...

...continuação

KP605	Swab retal	Julho-2013	27	15	KL24	O1	150	57,26	166	5367642	JAMBGX000000000
KP606	Swab retal	Outubro-2013	26	437	KL36	O4	291	57,25	198	5584735	JAMBGY000000000
KP607	Swab retal	Novembro-2013	26A	437	KL36	O4	219	57,26	222	5569163	JAMBGZ000000000
KP610	Secreção Traqueal	Fevereiro-2014	80	11	KL15	O4	125	57,29	231	5547620	JAMBHA000000000
KP72	Sangue	Julho-2016	61	16	KL51	O3b	96	57,06	452	5785030	JAMBHB000000000
KP728	Swab retal	Agosto-2020	11	437	KL36	O4	109	57,01	278	5865756	JAMBHC000000000
KP737	Swab retal	Julho-2020	11A	11	KL64	O2	116	57,01	305	5918775	JAMBHD000000000
KP738	Secreção Traqueal	Julho-2020	45	437	KL36	O4	109	57,03	334	5846602	JAMBHE000000000
KP78	Urina	Fevereiro-2016	87	11	KL64	O2	87	57,02	273	5873015	JAMBHF000000000
KP801	Swab retal	Agosto-2020	5	11	KL15	O4	126	57,89	2692	6459940	JAMBHG000000000
KP862	Swab retal	Agosto-2020	59	16	KL51	O3b	184	57,26	195	5526149	JAMBHH000000000
KP863	Swab retal	Agosto-2020	48	11	KL105	O2	134	57,17	269	5593011	JAMBHI000000000
KP864	Swab retal	Julho-2020	56	443	KL146	desconhecido	24,7	56,95	148	5612458	JAMBHJ000000000
KP867	Swab retal	Setembro-2020	9	307	KL102	O2	173	56,76	242	5742899	JAMBHK000000000
KP868	Swab retal	Setembro-2020	78	13	KL3	O1	111	56,47	273	5911741	JAMBHL000000000
KP869	Swab retal	Setembro-2020	40	437	KL36	O4	163	57,59	180	5219908	JAMBHM000000000
KP870	Urina	Outubro-2020	46	11	KL15	O4	129	57,36	200	5471552	JAMBHN000000000
KP871	Swab retal	Outubro-2020	46	11	KL15	O4	105	57,5	188	5322501	JAMBHO000000000
KP872	Secreção Traqueal	Dezembro-2020	22	11	KL64	O2	44,1	57,08	310	5790766	JAMBHP000000000
KP874	Swab retal	Outubro-2020	41A	11	KL15	O4	57,7	57,35	301	5457433	JAMBHQ000000000
KP875	Swab retal	Outubro-2020	41A	11	KL15	O4	78,9	57,24	277	5573854	JAMBHR000000000
KP876	Swab retal	Novembro-2020	43A	437	KL36	O4	205	57,35	203	5468311	JAMBHS000000000
KP877	Swab retal	Novembro-2020	45A	11	KL15	O4	132	57,33	186	5470484	JAMBHT000000000

continua...

...continuação

KP878	Secreção Traqueal	Fevereiro-2021	38	11	KL15	O4	52,4	57,39	216	5455479	JAMBHU000000000
KP879	Swab retal	Novembro-2020	46A	11	KL105	unknown	28,8	57,17	335	5588289	JAMBHV000000000
KP881	Swab retal	Novembro-2020	20C	11	KL64	O2	48,2	57,07	279	5846479	JAMBHW000000000
KP882	Swab retal	Novembro-2020	16	11	KL64	O4	35	57,24	489	5644912	JAMBHX000000000
KP884	Swab retal	Novembro-2020	19A	11	KL64	O2	65,8	57,04	260	5840691	JAMBHY000000000
KP885	Secreção Traqueal	Janeiro-2021	60A	16	KL51	O3b	291	56,98	282	5876619	JAMBHZ000000000
KP886	Secreção Traqueal	Julho-2020	13A	512	KL107	O2	152	56,72	213	5918482	JAMBIA000000000
KP887	Secreção Traqueal	Julho-2020	9	437	KL36	O4	149	57,03	188	5821703	JAMBIB000000000
KP888	Secreção Traqueal	Agosto-2020	1A	11	KL15	unknown	126	57,19	162	5571140	JAMBIC000000000
KP889	Sangue	Outubro-2020	3	11	KL15	unknown	116	57,12	195	5677706	JAMBID000000000
KP890	Secreção Traqueal	Novembro-2020	2A	11	KL15	O4	35,4	57,23	303	5581194	JAMBIE000000000
KP891	Secreção Traqueal	Novembro-2020	76	101	KL17	O1	89,1	57,06	249	5558301	JAMBIF000000000
KP896	Swab retal	Dezembro-2020	3A	11	KL15	O4	134	57,1	232	5701239	JAMBIG000000000
KP897	Swab retal	Dezembro-2020	83	323	KL21	unknown	82,9	57,62	153	5195646	JAMBIH000000000
KP898	Swab retal	Fevereiro-2021	55	307	KL102	O2	172	57,33	181	5420545	JAMBII000000000
KP899	Swab retal	Janeiro-2021	81	11	KL64	O2	33,8	57,02	266	5752267	JAMBIJ000000000
KP90	Sangue	Janeiro-2015	73	437	KL36	O3b	77	57,4	76	5429382	JACBOR000000000
KP901	Secreção Traqueal	Janeiro-2020	75	16	KL38	O2	133	57	325	5908951	JAMBIK000000000
KP902	Swab retal	Fevereiro-2021	65	16	KL64	O2	84,3	57,11	228	5578216	JAMBIL000000000
KP903	Swab retal	Julho-2018	4	11	KL15	unknown	153	61,86	753	12242806	JAMBIM000000000
KP904	Swab retal	Novembro-2018	6	11	KL15	O1	32	57,29	411	5566847	JAMBIN000000000
KP905	Swab retal	Novembro-2019	76A	101	KL36	O4	162	57,07	236	5530635	JAMBIO000000000
KP906	Secreção Traqueal	Mai-2018	32	437	KL36	O4	229	57,01	208	5809729	JAMBIP000000000

continua...

...continuação

KP908	Lavado Broncoalveolar	Maio-2018	32	437	KL36	O4	86,7	57,03	215	5803666	JAMBIQ000000000
KP910	Sangue	Dezembro-2018	41	11	KL15	O4	107	57,17	232	5522262	JAMBIR000000000
KP912	Secreção Traqueal	Novembro-2019	44	11	KL15	O4	55,8	57,43	217	5460450	JAMBIS000000000
KP914	Secreção Traqueal	Outubro-2019	74	443	KL146	O1	163	56,95	151	5601279	JAMBIT000000000