

Érica Walher Rifi Cunha

Investigação de subpopulações de *Klebsiella* spp. com antibiogramas distintos em episódios de infecção da corrente sanguínea em pacientes imunocomprometidos



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO

JULHO / 2024

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Dra. Renata Cristina Picão e coorientação da Mestre Luana Boff.

CIP - Catalogação na Publicação

C175i Cunha, Érica Walher Rifi
Investigação de subpopulações de *Klebsiella* spp.
com antibiogramas distintos em episódios de infecção
da corrente sanguínea em pacientes
imunocomprometidos / Érica Walher Rifi Cunha. --
Rio de Janeiro, 2024.
61 f.

Orientadora: Renata Cristina Picão.

Coorientadora: Luana Boff.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2024.

1. Imunossupressão. 2. infecção. 3. resistência
antimicrobiana. 4. variantes. 5. diagnóstico. I.
Picão, Renata Cristina, orient. II. Boff, Luana,
coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO(A): **ÉRICA WALHER RIFI CUNHA**

DRE: **120032646**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Lúcia Martins Teixeira (Presidente)

Prof. Marcia Garnica Maiolino

Msc. Patrícia Batista Rocha

Prof. Raquel Regina Bonelli (Suplente)

Título da Monografia: **“Investigação de subpopulações de *Klebsiella* spp. com antibiogramas distintos em episódios de infecção da corrente sanguínea em pacientes imunocomprometidos”**

Local: **Anfiteatro do IMPG/UFRJ**

Data e hora de início: **09 de julho de 2024 às 14:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota *dez (10,0)* neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, *09* de *julho* de 2024.

NOTA:

Banca Examinadora:

10

Lúcia Martins Teixeira

Prof. Lúcia Martins Teixeira (Presidente)

10

Marcia Garnica Maiolino

Prof. Marcia Garnica Maiolino

10

Patrícia Batista Rocha

Msc. Patrícia Batista Rocha

Prof. Raquel Regina Bonelli (Suplente)

Aluno(a):

Érica Walher Rifi Cunha

Érica Walher Rifi Cunha

Orientador(a)

Renata Cristina Picão

(e coorientador):

Profa. Renata Cristina Picão e Dra. Luana Boff

Coordenadora de

Marinella Silva Laport

TCC:

Profa. Marinella Silva Laport

Aos meus queridos pais, Andréia e Elio, irmã querida Camila, tios, André e Thays e amado Sami. Dos quais sempre acreditei em mim e apoiaram em minha jornada, muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora e professora, Dr.^a Renata Cristina Picão por ter me aceitado como aluna de iniciação científica e à minha coorientadora MSc. Luana Boff por me ensinar tanto durante o período de estágio. Sou grata a ambas por se dispuserem a me orientar na elaboração desse trabalho. Que me acolheram para ensinar e orientar. Agradeço infinitamente a ambas, pois conhecimento é o maior bem que há para disseminar.

Agradeço a todos aqueles do Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica que contribuíram para a finalização desse trabalho. Agradeço a todos os membros da banca, ao INPRA e às fontes financiadoras CAPES, CNPq e FAPERJ.

Érica Walher Rifi Cunha

Investigação de subpopulações de *Klebsiella* spp. com antibiogramas distintos em episódios de infecção da corrente sanguínea em pacientes imunocomprometidos

Orientador (a): Renata Cristina Picão

Coorientador (a): Luana Boff

Resumo da monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos pré-requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Pacientes acometidos por neoplasias hematológicas (NH) são mais suscetíveis a infecções, por isso a rápida implementação de terapia adequada é fundamental para o bom prognóstico desses pacientes. *Klebsiella pneumoniae* é um dos agentes etiológicos mais comuns em casos de infecções da corrente sanguínea (ICS) nessa população. Essa espécie possui alta identidade nucleotídica com outras espécies e subespécies do gênero que compõem o complexo *Klebsiella pneumoniae* (KpSC): *Klebsiella variicola*, *Klebsiella quasivariicola*, *Klebsiella quasipneumoniae* e as subespécies *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, *Klebsiella variicola* subsp. *variicola* e *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*. Esses microrganismos são indistinguíveis por abordagens de identificação baseadas em provas bioquímicas e espectrometria de massas envolvendo o algoritmo padrão. Portanto, é desconhecido o impacto de cada espécie que compõe esse complexo na etiologia das infecções. Ademais, estudos recentes têm apontado a ocorrência de variantes fenotípicas (Vf) em um mesmo episódio de infecção. Essas Vf apresentam, em geral, o mesmo aspecto colonial, e por isso, a identificação desse fenômeno não é alcançada pelo laboratório de microbiologia clínica. O presente trabalho teve como objetivo identificar espécies do KpSC e Vf coexistindo em episódios de ICS. Foram estudadas as hemoculturas de 16 pacientes com ICS internados na unidade de transplantes (UTX) do hospital terciário Complexo Hospitalar de Niterói, entre setembro/2020 e dezembro/2021. A identificação foi feita por meio de MALDI-TOF, empregando o software TypeR; e o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos por meio de disco-difusão, seguindo as diretrizes do BrCAST. Cepas com resistência a cefepima e carbapenemas foram pesquisadas para a presença de genes codificadores de ESBL e carbapenemases, respectivamente. Houve 4 casos em que mais de uma espécie do KpSC estava presente no episódio de ICS, sendo essas *K. variicola* subsp. *variicola*, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* e *K. pneumoniae*. A maior susceptibilidade aos antimicrobianos entre os microrganismos estudados foi observada para ceftazidima-avibactam, seguido por gentamicina, amicacina, tetraciclina, cloranfenicol, ceftolozane/tazobactam, ertapenem, imipenem, meropenem, sulfametoxazol-trimetoprima, cefoxitina, ciprofloxacina, aztreonam, cefepime, ceftriaxona, ampicilina-sulbactam, ceftazidima, cefoxitina, piperacilina-tazobactam e fosfomicina. Os genes de resistência *bla_{KPC}* e *bla_{CTX-M-1/2}* foram detectados somente em *K. pneumoniae*. Em 16 episódios de ICS de 14 pacientes houve Vf, sendo um por *K. variicola* subsp. *tropica* e as demais por *K. pneumoniae*. Houve 3 episódios de ICS com Vf em 3 pacientes em que observamos divergências quanto à presença dos genes pesquisados. Em um desses, cepas Vf com presença e outra ausência do gene *bla_{CTX-M-1/2}* foram identificadas em amostras pareadas. Os achados do presente trabalho reforçam a necessidade dos métodos de isolamento e identificação atuais de considerar a diversidade genética e fenotípica de *K. pneumoniae* em episódios de ICS na população do estudo, e também identificar as espécies do KpSC. Os impactos gerados pela ausência dessas informações no diagnóstico podem culminar em antibioticoterapia inadequada e influenciar negativamente o prognóstico dos pacientes.

Palavras-chave: Imunossupressão, infecção, resistência, variantes, diagnóstico.

Érica Walher Rifi Cunha

Investigação de subpopulações de *Klebsiella* spp. com antibiogramas distintos em episódios de infecção da corrente sanguínea em pacientes imunocomprometidos

Orientador (a): Renata Cristina Picão

Coorientador (a): Luana Boff

Abstract da monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos pré-requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

ABSTRACT

Patients with hematologic malignancies are particularly susceptible to infections, making rapid implementation of appropriate antimicrobial therapy crucial for a favorable prognosis in these cases. *Klebsiella pneumoniae* is one of the leading causative agents of bloodstream infections (BSI) in this population. This species shares high genetic similarity with other species/subspecies within the *Klebsiella pneumoniae* complex: *K. variicola*, *K. quasivariicola*, *K. quasipneumoniae*, and the subspecies *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, *K. variicola* subsp. *variicola*, and *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*. These species are indistinguishable by conventional identification methods, hampering the determination of each species' role in the infection etiology. Furthermore, recent studies indicate the occurrence of phenotypic variants (Vf) within the same infection episode. These Vf are indistinguishable through biochemical testing and mass spectrometry using standard methods. Consequently, the impact of each species within this complex on BSI etiology remains unclear. Recent studies have also noted the occurrence of phenotype Vf during BSI episodes these variants generally share identical colony morphology, posing laboratory challenges in their identification. This study aimed to identify KpSC species and Vf coexisting in BSI. Blood cultures from 16 patients with BSI admitted to the Transplant Unit (UTX) of the Complexo Hospitalar de Niterói (CHN) between September 2020 and December 2021 were analyzed. Identification was conducted using MALDI-TOF and TypeR software, and antimicrobial susceptibility testing was performed using disk diffusion following BrCAST guidelines. Strains resistant to cefepime and carbapenems were screened for ESBL and carbapenemase genes, respectively. There were 4 cases where more than one species of KpSC was identified in the BSI episode, including *K. variicola* subsp. *variicola*, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, and *K. pneumoniae*. Regarding susceptibility profiles, from the highest susceptibility to highest resistance, was detected against ceftazidime-avibactam, gentamicin, followed by amikacin, tetracycline, chloramphenicol, ceftolozane/tazobactam, ertapenem, imipenem, meropenem, trimethoprim-sulfamethoxazole, ceftazidime, ciprofloxacin, aztreonam, cefepime, ceftriaxone, ampicillin-sulbactam, ceftazidime, ceftazidime, piperacillin-tazobactam, and fosfomicin, respectively. Resistance genes were detected only in *K. pneumoniae*. 16 BSI episodes from 14 patients presented Vf, with two caused by *K. variicola* subsp. *tropica*, *K. variicola* subsp. *variicola* and the others by *K. pneumoniae*. In three BSI episodes with Vf were observed in three patients. We observed Vf showing both absence and presence of the studied genes in strains from a single BSI episode. The findings emphasize that the current isolation and identification methods have to consider the genetic and phenotypic diversity of *K. pneumoniae* in BSI episodes within this population, and to also identify the KpSC species involved. Lacking such information can impact the diagnosis, lead to inadequate antibiotic therapy and negatively affect patient prognosis.

Keywords: Immunosuppression, infection, resistance, variants, diagnostic.

RESUMO PARA LEIGOS

Érica Walher Rifi Cunha

Investigação de subpopulações de *Klebsiella* spp. com antibiogramas distintos em episódios de infecção da corrente sanguínea em pacientes imunocomprometidos

Orientador (a): Renata Cristina Picão

Coorientador (a): Luana Boff

Resumo para leigos da monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos pré-requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Pacientes com câncer no sangue são mais propensos a infecções, então é crucial iniciar rapidamente o tratamento correto para aumentar as chances de melhorar a recuperação desses indivíduos. *Klebsiella pneumoniae* é uma das principais causas de infecções da corrente sanguínea (ICS) nessa população. Esta bactéria é muito semelhante a outras espécies do gênero *Klebsiella*, como *Klebsiella variicola*, *Klebsiella quasivariicola*, e outras que compõem um complexo chamado *Klebsiella pneumoniae complex* (KpSC). Por essa razão, é difícil distinguir qual bactéria desse grupo é a responsável pela infecção. Além disso, estudos recentes descobriram que mais de uma bactéria do gênero *Klebsiella* pode causar um mesmo episódio de ICS, denominadas variantes fenotípicas (Vf). Por serem iguais visualmente, o laboratório clínico não consegue identificar esse fenômeno. Nosso estudo teve como objetivo identificar essas Vf e também diferentes espécies do KpSC coexistindo em episódios de ICS. Analisamos culturas de sangue de 16 pacientes internados na unidade de transplantes de um hospital de Niterói entre setembro de 2020 e dezembro de 2021. Encontramos quatro casos onde mais de uma espécie do KpSC estava presente durante um mesmo episódio de ICS. Também observamos que cepas de uma mesma infecção apresentaram diferentes perfis de sensibilidade a antibióticos. Descobrimos também que em 16 ICS de 14 pacientes, houve Vf, majoritariamente de *K. pneumoniae*, indicando uma diversidade genética significativa dessa espécie. Este estudo destaca a importância de métodos mais precisos para identificar diferentes espécies e Vf em infecções sanguíneas. A falta dessas informações pode levar a tratamentos inadequados e piorar o prognóstico dos pacientes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Composição taxonômica do KpSC.

Figura 2 - Organização da classificação de Jacoby-Bush-Medeiros correlacionada à classificação de Ambler e os tipos de betalactamases associados em cada classificação.

Figura 3- Relação de core genes envolvidos com a resistência por mutação a antimicrobianos em cepas *Klebsiella pneumoniae complex*.

Figura 4 - Desenho do estudo para identificação de espécies do KpSC e Vf coexistindo em episódios de ICS.

Figura 5- Distribuição das espécies do KpSC nos episódios de ICS dos pacientes do estudo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Identificação do KpSC entre as cepas da coorte.

Tabela 2- Porcentagem de resistência observada de cada espécie do KpSC para cada antimicrobiano do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Tabela 3- Casos de ICS polimicrobianas por KpSC e perfil de resistência aos antimicrobianos.

Tabela 4- Perfis de resistência observados nas cepas da coorte.

Tabela 5- Perfis de resistência aos antimicrobianos, fenótipo ESBL e genes codificadores de betalactamases observados nas cepas isoladas de cada episódio de ICS nos pacientes hematológicos. As discrepâncias do antibiograma das cepas de um mesmo episódio de ICS estão ressaltadas em vermelho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------|---|
| CTH | Células tronco hematopoiéticas |
| NH | Neoplasias hematológicas |
| MM | Mieloma múltiplo |
| LMA | Leucemia mieloide aguda |
| LLA | Leucemia linfoide aguda |
| LMC | Leucemia mieloide crônica |
| LLC | Leucemia linfoide |
| TCTH | Células tronco-hematopoiéticas |
| ICS | Infecção da corrente sanguínea |
| SRIS | Síndrome da resposta inflamatória sistêmica |
| BGN | Bacilos gram-negativos |
| MDR | Multirresistentes aos antimicrobianos |
| KpSC | <i>Klebsiella pneumoniae complex</i> |
| MALDI-TOF | <i>Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight</i> |
| EGM | Elementos genéticos móveis |
| HV | Hipervirulentas |
| ESBL | Betalactamases de espectro estendido |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| pAmpC | AmpC plasmidial |
| KPC | <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase |
| NDM | <i>New Delhi metallo-β-lactamase</i> |
| CTX-M | <i>Cefotaxime-hydrolysing β-lactamase isolated in Munich</i> |
| THG | Transferência horizontal de genes |
| Vf | Variante fenotípica |
| CHN | Complexo Hospitalar de Niterói |
| UTX | Unidade de transplantes |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PBP | proteínas ligadoras de penicilina |

Sumário

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1.1 Pacientes com neoplasias hematológicas..... | 14 |
| 1.2 Infecção da corrente sanguínea..... | 16 |
| 1.3 Diagnóstico microbiológico da ICS..... | 17 |
| 1.4 Microrganismos comumente associados à etiologia de ICS em pacientes hematológicos..... | 19 |
| 1.4.1 <i>Klebsiella</i> spp..... | 19 |
| 1.5 Mecanismo de ação de antimicrobianos de uso clínico com ação contra <i>Klebsiella</i> spp..... | 22 |
| 1.6.1 Resistência intrínseca..... | 24 |
| 1.6.2 Resistência adquirida..... | 24 |
| 1.6.3 Resistência aos betalactâmicos em <i>Klebsiella</i> spp. pela produção de betalactamases..... | 25 |
| 1.6.4 Variantes fenotípicas em ICS..... | 29 |
| 2 JUSTIFICATIVA..... | 31 |
| 3 OBJETIVOS..... | 32 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 32 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 32 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 32 |
| 4.1 População do estudo e processamento do material..... | 32 |
| 4.2 Critérios de seleção e processamento das amostras do estudo..... | 33 |
| 4.3 Identificação bacteriana..... | 34 |
| 5 RESULTADOS..... | 38 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 50 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 58 |
| 8 REFERÊNCIAS..... | 59 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pacientes com neoplasias hematológicas

A divisão, crescimento e diferenciação das células que compõem o tecido sanguíneo é denominado hematopoese, processo que ocorre na medula óssea e origina eritrócitos, plaquetas e leucócitos a partir de células pluripotentes denominadas células-tronco hematopoiéticas (CTH) (Rieger & Schroeder, 2012). A diferenciação das CTH para as de linhagem mielóide, linfóide e eritróide é precisamente controlada de acordo com as necessidades fisiológicas do corpo humano, dessa maneira, o seu reservatório é mantido estável. Na fase adulta, o processo de hematopoese é quase todo restrito ao esqueleto axial, entretanto, esse processo pode ser retomado no fígado e baço em ocasiões onde a medula óssea não está funcional (Kim, 2010).

As neoplasias que envolvem células de linhagem linfóide e mielóide são aqui referidas como neoplasias hematológicas (NH). A NH é, portanto, caracterizada pelo desenvolvimento de células neoplásicas do tecido hematopoiético, ou seja, são transformações benignas ou malignas celulares no tecido sanguíneo, sendo esse também um processo pelo qual uma célula neoplásica passa sua alteração genética para sua progênie (Parslow *et al.*, 2004; Mahon & Lehman, 2019). Isso pode levar à má formação do tecido hematológico e seus constituintes, além de impactar no funcionamento do mesmo e na homeostase do organismo do indivíduo acometido pela NH (Parslow *et al.*, 2004).

As NH malignas são as leucemias, mieloma múltiplo (MM), linfoma de Hodgkin e linfoma não-Hodgkin (Paes *et al.*, 2002). Os termos leucemia e linfomas destinam-se a duas formas diferentes de NH. Os tipos de NH são classificados em: leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia mielóide crônica (LMC), leucemia linfóide crônica (LLC) e MM. O termo “linfoma” refere-se a proliferação de células linfóides neoplásicas, que formam uma massa sólida (Parslow *et al.*, 2004). Segue definições de origem dessas patologias no quadro 1.

Quadro 1 - Leucemias e Linfomas e relações de origem celular

| Tipo de leucemia | Células envolvidas na patologia |
|----------------------|--|
| LMA | Crescimento descontrolado de células blasticas de característica mielóide. |
| LMC | Associado à anormalidade no cromossomo 9 e 22. |
| LLA | Produção descontrolada de blastos e bloqueio na produção basal de glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas. |
| MM | Origem a partir das células linfóides B. |
| Linfomas | |
| Linfomas de Hodgkin | Presença de células de Hodgkin |
| Linfomas não-Hodgkin | Células com características de células B, T ou NK. |

Fonte: Adaptado de Hamerschlag, Nelson. “Leucemia: fatores prognósticos e genética”. *Jornal de pediatria*. 2008, v. 84, n. 4 suppl, pp. S52-S57. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0021-75572008000500008>>. (Machado *et al.*, 2004).

Os linfomas de Hodgkin são linfomas que têm como principal característica a presença de células de Reed-Sternberg e/ou de Hodgkin em neoplasia do tecido linfóide. A presença dessas células na neoplasia envolve um contexto de inflamação característico que inclui estroma, linfócitos, histiócitos, eosinófilos e monócitos. Esse tipo de neoplasia geralmente ocorre no tecido ganglionar, mas pode ocorrer no tecido extra-ganglionar mais raramente. As células de Hodgkin são caracterizadas pela presença de núcleo unilobulado, enquanto as de Reed-Sternberg possuem como característica a presença de núcleo multilobulado (Machado *et al.*, 2004; Weniger & Küppers, 2021). Quanto aos linfomas não-Hodgkin, são neoplasias que envolvem mutações somáticas, ou seja, que ocorrem em células que formam os tecidos e órgãos. Nesse tipo de neoplasia, essas mutações ocorrem em células linfóides progenitoras, a célula neoplásica costuma apresentar fenótipo de células B, T ou NK (Oliveira *et al.*, 2021).

Os tratamentos empregados para as NH incluem agentes quimioterápicos, radioterapia e o transplante de células tronco-hematopoiéticas (TCTH) (Keohane *et al.*, 2019). Devido à

implementação desses tratamentos o paciente pode desenvolver mielossupressão, imunossupressão, neutropenia além de danos à mucosa (Keohane *et al.*, 2019). Como resultado, os pacientes com neoplasias possuem grande susceptibilidade a infecções (Almeida *et al.*, 2005).

1.2 Infecção da corrente sanguínea

A presença de bactéria no sangue é denominada bacteremia. Pode ocorrer de forma contínua, transiente ou intermitente, mas quando está associada a sinais e sintomas é denominada infecção da corrente sanguínea (ICS). Esse quadro pode levar à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), da qual varia em quadros de sepse, sepse grave e choque séptico (Quadro 2).

Quadro 2 - Terminologia para os quadros de síndrome da resposta inflamatória sistêmica.

| Termo | Classificação atual | Característica |
|----------------|------------------------|---|
| Sepse | Infecção sem disfunção | Infecção suspeita ou confirmada, sem disfunção orgânica, de forma independente da presença de sinais de SRIS ¹ . |
| Sepse grave | Sepse | Infecção suspeita ou confirmada associada a disfunção orgânica, de forma independente da presença de sinais de SRIS. |
| Choque séptico | Choque séptico | Sepse que evoluiu com hipotensão não corrigida com reposição volêmica (PAM \leq 65 mmHg), de forma independente de alterações de lactato. |

Quadro 2 - Terminologia para quadros de ICS. 1- Síndrome da resposta inflamatória sistêmica. FONTE: (ILAS – Instituto Latino Americano de Sepse, [s.d.]).

Pacientes imunocomprometidos, que passam por transplante de órgãos, idosos, pacientes com câncer, por exemplo, são comumente acometidos por ICS (Safdar & Armstrong, 2011; Shi *et al.*, 2024). Ademais, indivíduos que estão em tratamento intensivo ficam susceptíveis à colonização do trato gastrointestinal, muitas vezes por bactérias resistentes aos

antimicrobianos que é um importante fator de risco para o posterior desenvolvimento de infecções difíceis de tratar (Shi *et al.*, 2024). As ICS constituem uma das complicações mais comuns em pacientes com NH sob regime quimioterápico (S. Chen *et al.*, 2021a). Além de ser causa da alta mortalidade nessa população, também aumenta o tempo, custo de tratamento e hospitalização (Carvalho *et al.*, 2021). As características mais comuns relacionadas ao desenvolvimento de ICS em pacientes com NH é a neutropenia febril, utilização de dispositivos invasivos (ex.: cateteres) e idade acima de 40 anos (Carvalho *et al.*, 2021; S. Chen *et al.*, 2021a; Choi *et al.*, 2022). O dano da barreira da mucosa pode facilitar o desenvolvimento da ICS, devido a translocação de bactérias colonizadoras do trato gastrointestinal (Carvalho *et al.*, 2021; S. Chen *et al.*, 2021a).

Altas taxas de mortalidade são atribuídas à ICS nessa população. Em estudo conduzido na Itália, a taxa de mortalidade 30 dias após hemocultura positiva foi de 20,3% para as infecções causadas por bactérias, bacilos gram-negativos (BGN) ou bactérias gram-positivas (Tumbarello *et al.*, 2007). Outro estudo, conduzido com pacientes hematológicos de 49 hospitais nos Estados Unidos, observou mortalidade ainda maior para ICS de etiologia bacteriana: 31% em pacientes não neutropênicos e 36% em pacientes neutropênicos (Wisplinghoff *et al.*, 2003). Tamanha mortalidade está diretamente associada aos seguintes fatores: tempo prolongado de neutropenia febril, implementação de antibioticoterapia inadequada; tempo de identificação do patógeno e envolvimento de bactérias resistentes a antimicrobianos no curso da infecção, especialmente bactérias resistentes aos carbapenêmicos (Wisplinghoff *et al.*, 2003; Tumbarello *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2020; S. Chen *et al.*, 2021b; Yin *et al.*, 2023). Devido aos impactos tanto da imunossupressão mediada pelo tratamento da doença de base e a própria doença, a resposta imunológica celular e humoral do paciente acometido pela bacteremia pode ser limitada e, assim, a implementação do tratamento adequado no menor tempo possível é de fundamental importância para o bom prognóstico dos pacientes, o que é possibilitado pelo diagnóstico microbiológico dessas infecções.

1.3 Diagnóstico microbiológico da ICS

A identificação do patógeno e do seu perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos é crucial para o tratamento adequado da ICS, de forma a impedir que a infecção evolua para desfechos desfavoráveis dos pacientes. Os fatores que influenciam no processo de identificação e na qualidade do laudo são: os possíveis agentes etiológicos na bacteremia, como a amostra é

coletada, o volume sanguíneo da amostra; a forma como é feito o transporte até o laboratório, o tempo de processamento das amostras e a interpretação de resultados (Forbes *et al.*, 2007).

Para a identificação do patógeno é necessária a coleta da amostra sanguínea do paciente por punção venosa, e todo o procedimento laboratorial para identificação e elaboração de laudo é protocolado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2022). Além disso, é recomendado realizar a coleta antes da administração de medicamentos para o paciente. O volume coletado deve corresponder a 10% do volume total do frasco de coleta, e quanto maior o volume de sangue, maior a chance de recuperação do microrganismo causador da infecção. O número de amostras coletadas varia dependendo da condição do paciente. Em pacientes com infecções sistêmicas é indicado a coleta de duas amostras de sítios diferentes (ex.: braço esquerdo e direito), caso o paciente tenha cateter de longa utilização é indicado a coleta do material sanguíneo pelo cateter também. Em bacteremia de origem indeterminada, é indicado a coleta de 4-6 amostras de sítios diferentes, em 48 horas. Caso passem 24 horas de cultivo e não haja crescimento, é indicado realizar mais duas coletas. Em pacientes febris, é indicado realizar a coleta do material sanguíneo antes do pico febril e da administração de antibióticos. Após a coleta, o material é levado imediatamente ao laboratório de microbiologia, sem refrigeração.

O sangue coletado disposto em garrafas de sistema de incubação automatizado BD BACTEC™, por exemplo, ficam na incubadora por cerca de 5 a 7 dias a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Forbes *et al.*, 2007; Anvisa, 2022). Caso haja indicação de crescimento, uma alíquota do sangue é submetida à bacterioscopia, empregando a coloração de Gram. O resultado da bacterioscopia contribui para a seleção dos meios de cultivo onde será realizada a semeadura do material clínico e incubação por pelo menos 18-24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Meios enriquecidos como ágar sangue e chocolate são sempre utilizados para possibilitar a recuperação do maior espectro de microrganismos, incluindo as bactérias fastidiosas; e os meios seletivos e indicadores para grupos bacterianos específicos podem ser empregados de acordo com o resultado da bacterioscopia, como MacConkey para BGN, manitol salgado para estafilococos, e bile esculina para enterococos (Anvisa, 2022). Completa a etapa de semeio, o crescimento obtido é interpretado. Culturas onde se observa mais de um morfotipo colonial, podem significar infecção polimicrobiana ou contaminação durante a coleta, assim como a positividade de somente uma garrafa de hemocultura. Nesses casos, é indicado avaliar se o mesmo ocorre em outras garrafas coletadas para avaliação da mesma ICS e, se a dúvida persistir, uma nova coleta deve ser feita (Anvisa, 2022). Caso na avaliação do crescimento seja estipulado que não há contaminação, um representante de cada morfotipo colonial observado deve ser submetido às

etapas de identificação e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, já que assume-se que a população que causa a infecção é clonal. A identificação é feita através de provas bioquímicas, que pode ser realizado em sistema automatizado VITEK®, por exemplo, ou por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. Em sequência, após identificação bacteriana, é realizado o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos segundo as diretrizes do BrCAST (Anvisa, 2022).

1.4 Microrganismos comumente associados à etiologia de ICS em pacientes hematológicos

Os grupos bacterianos frequentemente associados a infecções em pacientes hematológicos são *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Escherichia coli*. Já as espécies e gêneros mais prevalentes e associados à alta morbidade são *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *P. aeruginosa* (Safdar & Armstrong, 2011), todos bacilos gram-negativos (BGN). Os BGN são denominados dessa forma devido à sua forma em bastão e às propriedades de coloração ao método Gram, fruto da incapacidade da fina camada de peptidoglicano em reter o cristal violeta, o que as diferencia das bactérias gram-positivas. Neste grupo de bactérias, a família *Enterobacteriaceae* da ordem *Enterobacterales* se destaca pela ampla gama de gêneros bacterianos capazes de causar infecções, como *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. Neste trabalho será destacado o gênero *Klebsiella* spp., prevalente em infecções em indivíduos com neoplasias, comumente reportado em infecções associadas à assistência à saúde e preocupante pela emergência de cepas multirresistentes aos antimicrobianos (*multidrug resistant*-MDR) (Carvalho *et al.*, 2021; Choi *et al.*, 2022; Safdar & Armstrong, 2011; Waszczuk-Gajda *et al.*, 2020).

1.4.1 *Klebsiella* spp.

A primeira bactéria desse gênero foi isolada em 1885 por Trevisan, e seu nome foi dado em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs. Esse gênero compreende espécies encapsuladas, não-móveis, oxidase-negativas, não formadoras de esporos e fermentadoras de glicose (Dong *et al.*, 2022).

Alguns dos membros de *Klebsiella* spp. compartilham cerca de 90% da identidade nucleotídica de seu material genético com um complexo não padronizado taxonomicamente, porém referido como *Klebsiella pneumoniae complex* (KpSC). Espécies classificadas dentro desse complexo compartilham entre 95% e 96% de identidade nucleotídica com *K. pneumoniae*,

e são referidas pela abreviação indicada ao lado do nome de cada espécie (Dong *et al.*, 2022; Wyres *et al.*, 2020). *K. pneumoniae* é KP1; *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* é KP2; *K. variicola* subsp. *variicola* é KP3; *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* é KP4; *K. variicola* subsp. *tropica* é KP5; *K. quasivariicola* é KP6; e *K. africana* é KP7 (Dong *et al.*, 2022).

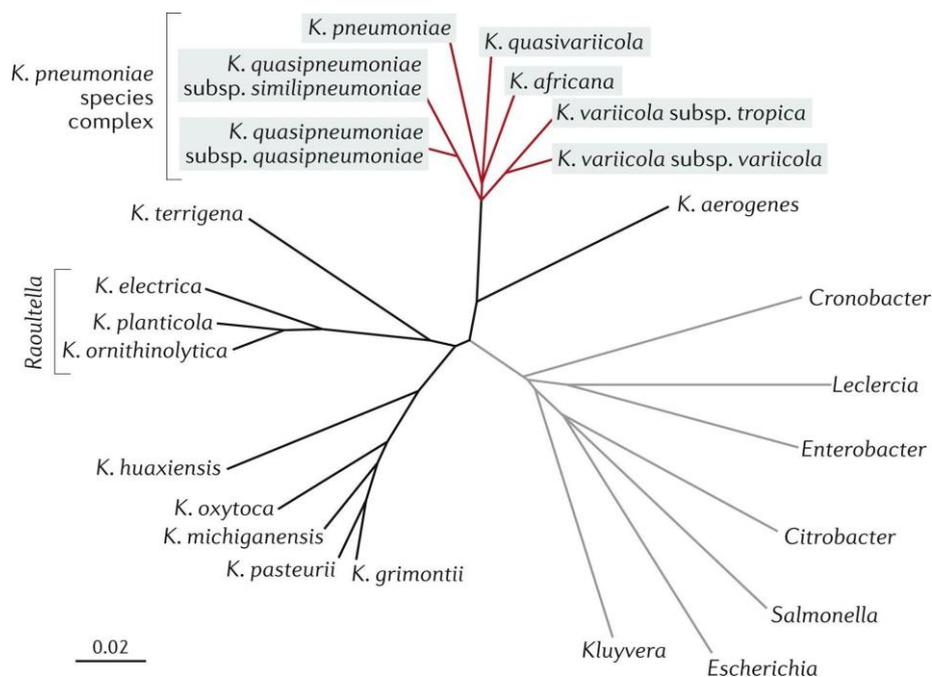


Figura 1 - Composição taxonômica do KpSC. Fonte: Wyres *et al.*, 2020. Acesso em: 27 de junho de 2024.

Devido à pouca diferença genética entre as espécies que compõem o KpSC, a discriminação dessas espécies se torna um obstáculo. A espectrometria de massas por MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight*) é uma ferramenta que permite a identificação de alta precisão de bactérias presentes em espécimes clínicos (Dinkelacker *et al.*, 2018). Contudo, a ferramenta não é acurada para a discriminação entre as espécies que compõem o KpSC. Devido ao fato de o KpSC ser um complexo pouco explorado e recém descoberto no qual seus componentes são comumente identificados como *K. pneumoniae*, entende-se que há grande subnotificação das espécies do KpSC no âmbito clínico, prejudicando a compreensão do papel de cada espécie na etiologia e prognóstico das infecções (Wyres *et al.*, 2020; Bridel *et al.*, 2021).

A composição de alguns biomarcadores presentes em espécies do KpSC permitiu a realização da identificação precisa por meio do uso de MALDI-TOF seguida da análise de diferença de m/z desses biomarcadores, e desenvolvimento de uma ferramenta online, o TypeR (Bridel *et al.*, 2021). Dois conjuntos de biomarcadores são utilizados como referência: o

primeiro composto por 29 proteínas presentes no KpSC, para identificação do complexo propriamente, e o segundo composto por quatro proteínas com diferentes isoformas, que correspondem a valores de m/z específicos associados a cada espécie do KpSC (Bridel *et al.*, 2021).

Geralmente, *Klebsiella* spp. são encontradas em modo de vida livre, em fontes ambientais, e no trato gastrointestinal de indivíduos e animais (Mahon & Lehman, 2019). Embora sejam comuns na microbiota do ser humano, em situações em que o equilíbrio é afetado, podem ocasionar pneumonia, ICS e infecção do trato urinário no hospedeiro (Mahon & Lehman, 2019). No ambiente hospitalar, a transmissão de patógenos pode ocorrer por agentes de saúde, instrumentos ou através das medicações parietais. Os microrganismos mais presentes no ambiente nosocomial frequentemente apresentam resistência a diversos antimicrobianos (Brooks *et al.*, 2014). É importante destacar que espécies de *Klebsiella* spp. podem colonizar não só pacientes que passam longos períodos no hospital, como também os que recebem terapia com antibióticos (Podschun & Ullmann, 1998). Devido à pressão seletiva que ocorre na microbiota de pacientes imunossuprimidos, o aumento de espécies resistentes aos antimicrobianos tende a prevalecer na microbiota. Conforme o regime profilático de antibióticos é suspenso, os microrganismos susceptíveis voltam a colonizar. Muitas das infecções que acometem pacientes imunossuprimidos tendem a ser de origem endógena (Safdar & Armstrong, 2011). No entanto, do KpSC, a *K. pneumoniae* foi reportada como o patógeno que não só acomete indivíduos imunodeficientes, mas também aqueles que são imunocompetentes (Paczosa & Mecsas, 2016). Ademais, esta espécie prevalece em coleções clínicas, sendo isolada em 85% das coleções (Wyres *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2022). Atualmente, faz parte do grupo de microrganismos classificados como patógenos altamente virulentos e resistentes aos antimicrobianos, sendo esse o “ESKAPE”, grupo composto por: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. Outras espécies do gênero *Klebsiella* spp. têm sido reportadas clinicamente, como *K. variicola* e *K. oxytoca* (Dong *et al.*, 2022).

Os fatores de virulência que contribuem para a infecção por espécies de *Klebsiella* spp. são: a produção de endotoxina, presença de cápsula polissacarídica assim como seus constituintes, o polissacarídeo variável capsular o antígeno K e o lipopolissacarídeo (LPS) e antígeno O. Além disso, a biossíntese de sideróforo, fímbrias colaboram para a sobrevivência bacteriana e adesão, respectivamente (Y. Chen *et al.*, 2020).

Os antimicrobianos que podem empregados para o tratamento de ICS, de acordo com a origem da mesma, causadas por KpSC incluem diversas classes como fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, sulfametoxazol-trimetoprima, polimixinas e betalactâmicos (Timsit *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2020; S. Chen *et al.*, 2021b). Entretanto, com a emergência e disseminação de cepas resistentes aos antimicrobianos, as opções terapêuticas ficaram limitadas, tornando bastante desafiador o tratamento das infecções causadas por KpSC (Timsit *et al.*, 2014; Pitout *et al.*, 2015).

1.5 Mecanismo de ação de antimicrobianos de uso clínico com ação contra *Klebsiella* spp.

Os aminoglicosídeos são compostos antimicrobianos que possuem estreptidina ou 2-desoxiestreptamina, que são moléculas constituídas de um esqueleto de aminociclitol ligado a um ou mais açúcares aminados por ligações glicosídicas. Atuam a partir da adesão a proteínas da subunidade ribossômica 30S, interferindo na ligação do RNA de transferência formilmetionil. Provocam a leitura incorreta dos códons presentes no mRNA e impedem a síntese de complexos de iniciação onde a síntese de proteína é iniciada (Goering *et al.*, 2020).

As tetraciclinas compõem uma família de substâncias de estruturas cíclicas, sendo compostos bacteriostáticos. Impedem que o RNA de transferência aminoacil se ligue nos receptores do ribossomo, ao se ligar na porção da subunidade ribossômica 30S (Goering *et al.*, 2020).

As quinolonas afetam a replicação do cromossomo ao inibir a atividade das topoisomerasas envolvidas no processo (Goering *et al.*, 2020).

As sulfonamidas são estruturas análogas ao ácido para-aminobenzoico, de caráter bacteriostático. Elas atuam em competição com a molécula do ácido para-aminobenzoico pela enzima dihidropteroato sintetase, presente na síntese de purinas e pirimidinas (Goering *et al.*, 2020).

Assim como as sulfonamidas, a trimetoprima é um análogo estrutural que inibe síntese de purinas e pirimidinas. A inibição da enzima di-hidrofolato redutase impede a formação do ácido tetrahidrofólico, um intermediário na formação das bases nitrogenadas. Embora essa enzima exista em mamíferos, sua toxicidade é seletiva e depende da afinidade pela enzima bacteriana à trimetoprima (Goering *et al.*, 2020).

A fosfomicina é um antimicrobiano de amplo espectro, que possui ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. O mecanismo de ação desse antimicrobiano envolve a

inibição da síntese de peptidoglicano associada a enzima MurA (Adhikari *et al.*, 2023). É um antibiótico com baixa toxicidade, amplamente utilizado para tratar infecções do trato urinário, mas também utilizado para tratar infecções em outros sítios (Silver, 2017).

Os betalactâmicos compõem uma classe de substâncias antibacterianas com toxicidade seletiva que têm como alvo as proteínas ligadoras de penicilina (PBP), responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana, pois realizam as ligações cruzadas do peptidoglicano. Esses compostos são formados por um anel betalactâmico e a distinção entre antimicrobianos desse grupo se dá pela variação da estrutura molecular e associação a outras moléculas em sua composição. São classificados em penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos, alguns desses antimicrobianos estão associados à inibidores de betalactamase (Arruda *et al.*, 2019; Goering *et al.*, 2020).

Os betalactâmicos são os antimicrobianos mais prescritos em unidade intensiva de tratamento para diversos tipos de infecções, entretanto, a resistência a essa classe se tornou uma grande preocupação (Noval *et al.*, 2020).

1.6 Mecanismos de resistência aos betalactâmicos em *Klebsiella* spp.

Existem diferentes mecanismos bioquímicos que resultam na resistência aos betalactâmicos (Ahmed *et al.*, 2023). Os quatro principais incluem: impedimento da entrada do antimicrobiano, alteração do sítio alvo, transporte ativo (efluxo), e inativação ou modificação do composto antimicrobiano (Ahmed *et al.*, 2023). O impedimento da entrada consiste na repressão ou diminuição da expressão de porinas da membrana externa por onde antimicrobianos ganham acesso às células em bactérias gram-negativas, por mutações ou mecanismos regulatórios. A alteração do sítio alvo consiste na modificação da estrutura com a qual o antimicrobiano se associa para exercer sua atividade. Essa alteração pode ocorrer através da substituição de aminoácidos por mutações, por exemplo, o que evita a ligação do antimicrobiano ao sítio alvo (Darby *et al.*, 2023). O transporte ativo do antimicrobiano para o exterior da célula é mediado por bombas de efluxo presentes na membrana celular bacteriana. Sua atividade diminui as concentrações do antimicrobiano no meio intracelular, prevenindo-o de alcançar o sítio alvo (Gaetano *et al.*, 2023). A alteração enzimática do composto antimicrobiano modifica a estrutura do fármaco, impedindo sua ação. Exemplos desse mecanismo é a degradação do anel betalactâmico por betalactamases (Darby *et al.*, 2023). Os mecanismos de resistência podem ser classificados como intrínsecos e extrínsecos ou adquiridos. A resistência intrínseca é definida como a resistência inerente presente na bactéria,

determinada pelo genoma da espécie bacteriana como todo, independente de pressões seletivas (Cox & Wright, 2013). A resistência adquirida é definida como resistência que não faz parte da característica da espécie, que pode ser desenvolvida por mutações ou aquisição de genes. Essa última é modulada por fatores do nicho onde a bactéria se encontra (Sagar *et al.*, 2019).

1.6.1 Resistência intrínseca

A *K. pneumoniae* é intrinsecamente resistente à ampicilina, pois em seu genoma tem o gene *bla_{SHV}* que codifica a enzima betalactamase SHV, capaz de hidrolisar aminopenicilinas, como as amoxicilinas e ampicilinas (Arruda *et al.*, 2019; Wyres *et al.*, 2020). Ademais, genes ortólogos ao *bla_{SHV}* em outras espécies do KpSC é o *bla_{LEN}* e *bla_{OKP}*. Genes que codificam SHV já foram identificados em elementos genéticos móveis (EGM), tornando possível a transferência entre outras espécies, culminando com a resistência adquirida (Guo *et al.*, 2016; Wyres *et al.*, 2020).

1.6.2 Resistência adquirida

As bactérias possuem a capacidade de transferir EGM entre a mesma espécie ou não, que trazem genes que conferem características que podem favorecer sua sobrevivência. A transferência desses EGM pode ser horizontal ou vertical. A transferência horizontal de genes (THG) ocorre entre células distintas, não relacionadas por divisão celular. Já a transferência vertical ocorre de uma célula mãe para uma célula filha. A dinâmica da transferência horizontal desses genes ocorre principalmente por conjugação, transdução, vesiculação ou transformação (Dell'Annunziata *et al.*, 2021; Madigan *et al.*, 2016). Uma vez adquiridos, EGMs podem ser integrados ao cromossomo bacteriano, garantindo assim, posterior transmissão vertical (Madigan *et al.*, 2016). Portanto, as características adquiridas pelas bactérias frequentemente são mantidas nas linhagens posteriores. No ambiente hospitalar, é comum haver cepas bacterianas que carregam plasmídeos que as favorecem contra a ação antimicrobiana. Os plasmídeos são EGM que possuem sua própria origem de replicação e, assim, tem replicação independente do cromossomo. Os EGM podem conferir tanto maior adaptabilidade à bactéria no sítio de colonização através do aprimoramento dos mecanismos de virulência, quanto resistência a antimicrobianos utilizados para combater o microrganismo. Essa dinâmica pode colaborar para o surgimento de cepas hipervirulentas (HV) ou MDR (Dong *et al.*, 2022).

1.6.3 Resistência aos betalactâmicos em *Klebsiella* spp. pela produção de betalactamases

Enquanto os betalactâmicos são agentes bactericidas amplamente prescritos para infecções bacterianas (Bush & Bradford, 2016), as betalactamases são antagonistas no mecanismo de ação desses antimicrobianos. São responsáveis por hidrolisar o anel betalactâmico, inativando a ação desses compostos. Esse é o mecanismo de resistência bacteriana mais estudado em BGN (Bush & Bradford, 2020). Após sua síntese, as betalactamases são lançadas no espaço periplasmático onde se encontram seu alvo - o anel betalactâmico, e impedem que o antimicrobiano se ligue à PBP (Majumdar *et al.*, 2023). Esse mecanismo apresenta impacto importante no desenvolvimento da resistência aos betalactâmicos e encontra-se amplamente disseminado em espécies do gênero *Klebsiella* spp. (M. J. Martin *et al.*, 2023).

Existem muitos tipos de betalactamases com diferentes espectros de ação e sistemas de classificação foram propostos para estruturar o estudo dessas enzimas. Dois sistemas de classificação dessas enzimas são comumente empregados para essa finalidade, um proposto por Ambler (1982), baseado na estrutura da enzima; e o proposto por Bush, Jacoby e Medeiros (Bush *et al.*, 1995), baseado na gama de substratos e perfil de inibição dessas enzimas. Ambler classifica a enzima em quatro grupos diferentes, A, B, C e D, sendo A, C e D enzimas que utilizam serina para hidrólise, enquanto B são metaloenzimas dependentes de íons de zinco divalentes para a hidrólise, conforme apresentado na figura 2.

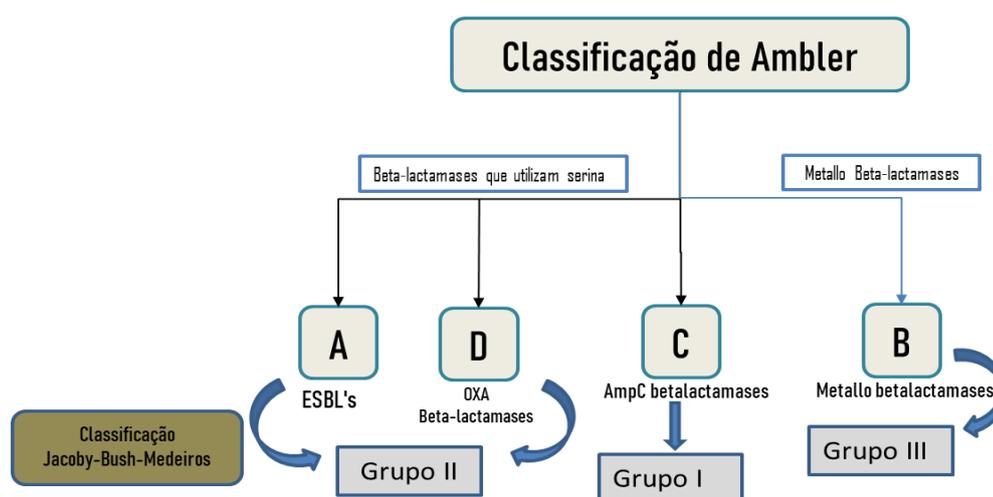


Figura 2 - Organização da classificação de Jacoby-Bush-Medeiros correlacionada à classificação de Ambler e os tipos de betalactamases associados em cada classificação. Adaptado de Noster *et al.*, 2021.

As betalactamases de preocupação em KpSC incluem as carbapenemases, cefalosporinas tipo AmpC mediada por plasmídeos e as betalactamases de espectro estendido (ESBL) (Yu *et al.*, 2024).

As ESBL são enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar as oximino-cefalosporinas de amplo espectro, ou seja, cefalosporinas de terceira e quarta geração, mas também os monobactâmicos (aztreonam), cefalosporinas de primeira e segunda geração e penicilinas. Entretanto, não conferem resistência a carbapenêmicos e podem ser neutralizadas por inibidores como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam, embora essa característica não se traduza em eficácia terapêutica das associações de betalactâmicos com inibidores de betalactamases (Bush & Bradford, 2020).

A presença de ESBL pode ser detectada em diversas espécies da ordem *Enterobacterales*, mas os frequentemente associados são a *E. coli* e a *K. pneumoniae*. As ESBL's apresentam ampla diversidade *in natura* e podem ser classificadas dentro das seguintes famílias: Temoneira (TEM), *Sulphydryl reagent variable* (SHV), *Inhibitor-resistant TEM* (IRT), *Complex mutant derived from TEM-1* (CMT), *Cefotaxime-hydrolysing β -lactamase isolated in Munich* (CTX-M), *Guiana-extended spectrum* (GES), *Pseudomonas Extended resistant* (PER), *Vietnam extended-spectrum β -lactamase* (VEB), *Belgium extended β -lactamase* (BEL) e Tlahuica (TLA). Entre 1980 e os anos 2000, as ESBL classe A de Ambler, TEM e SHV costumavam ser as ESBL predominantes globalmente, mas atualmente a mais difundida e de grande preocupação são as pertencentes à família CTX-M (Bush, 2018; Castanheira *et al.*, 2021). A divisão de ESBL CTX-M é feita em seis grupos, baseado na homologia das sequências peptídicas: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 e KLUC (Castanheira *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2024).

Análises genômicas de plasmídeos do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) identificou maior incidência de CTX-M-14 (grupo CTX-M-9) e CTX-M-15 (grupo CTX-M-1) ao redor do mundo (Yu *et al.*, 2024). Na Europa e Ásia, os tipos mais incidentes foram CTX-M-1, CTX-M-14 e CTX-M-55, sendo a *K. pneumoniae* um dos hospedeiros mais comuns dessas enzimas. Na América Latina, a predominância dos grupos CTX-M-1 e CTX-M-9 foi constatada (Castanheira *et al.*, 2021). Ademais, foi analisada a predominância dos grupos CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-9 em cepas de *K. pneumoniae* oriundas de amostras de colonização de pacientes em unidades de terapia intensiva no Brasil (Bomfim *et al.*, 2023). *K. pneumoniae* produtora de CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-9 também já foram detectadas de forma predominante em amostras clínicas de hospitais do sudoeste do Brasil (Borghetti *et al.*, 2023).

Consonante à emergência de CTX-M, há a preocupação da disseminação de cefalosporinases do tipo AmpC entre KpSC. Esse tipo de enzima começou a ter maior

incidência em altos níveis de cópia de plasmídeos em espécies bacterianas, por volta de 1990, e se tornou uma preocupação por ser transferível entre espécies e resultar na resistência aos betalactâmicos de diversas classes, incluindo cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos (Bush, 2018). Genes codificadores dessas enzimas são intrínsecos aos cromossomos de espécies como *Citrobacter freundii*, *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter cloacae complex*. Nesses organismos, a produção de AmpC está sujeita a mecanismos regulatórios que culminam em resistência às cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos somente em condições de hiperexpressão (Bush & Bradford, 2020). Entretanto, genes codificadores dessas enzimas foram mobilizados e disseminados por EGMs a outras espécies bacterianas, incluindo KpSC. O primeiro relato de AmpC plasmidial (pAmpC) aconteceu em 1989, a partir de uma amostra de *K. pneumoniae* oriunda de ferida de um paciente internado na Coréia do Sul (Bush & Bradford, 2020). Em 2018, foram detectadas *K. pneumoniae* produtoras de pAmpC em diferentes hospitais, oriundos de pacientes internados em unidades de tratamento intensivo na Índia (Gogoi *et al.*, 2023). No mundo foi averiguada a predominância de bactérias dos gêneros *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. e *Pseudomonas* spp. carreadoras de pAmpC em países asiáticos e do Oriente Médio (Gogoi *et al.*, 2023). A ocorrência de pAmpC em alimentos e animais já foi constatada no Brasil (Melo *et al.*, 2018; Koga *et al.*, 2019; Botelho *et al.*, 2020). Em isolados clínicos, poucos estudos relatam a ocorrência de pAmpC no Brasil portanto sua incidência é pouco conhecida (Dias *et al.*, 2008; Raro *et al.*, 2020), já houve relato nesse nicho, de um isolado clínico produtor de pAmpC do gênero *Klebsiella* spp. (Campana *et al.*, 2013).

As carbapenemases são enzimas capazes de hidrolisar praticamente todos os betalactâmicos, incluindo os carbapenêmicos. As enzimas de importância clínica já reportadas em *Klebsiella* spp. são: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), as do tipo oxacillinase (OXA-48), *active-on-imipenem metallo betalactamase* (IMP), *Verona integron-encoded metallo-betalactamase* (VIM), *New Delhi metallo-β-lactamase* (NDM) e *Brazilian Klebsiella carbapenemase* (BKC) (Bharathwaj *et al.*, 2021; Bush & Bradford, 2020).

A família do tipo KPC emergiu na costa leste dos EUA e sua distribuição é amplamente disseminada pelo mundo, sendo umas das mais frequentes em termos de incidência global, inclusive no Brasil (Camargo *et al.*, 2023; Sader *et al.*, 2023). Possui a capacidade de hidrolisar penicilinas, a maioria das cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, porém não é capaz de hidrolisar eficientemente a ceftazidima (Bush & Bradford, 2020; Palzkill, 2018). Espécies que expressam essa enzima não são suscetíveis à inibição pelo clavulanato ou

tazobactam, porém podem ser inibidas pelo avibactam ou vaborbactam (Bush & Bradford, 2020). Entretanto, podem não ser inibidas por ceftazidima-avibactam caso expressem enzimas KPC mutantes com atividade catalítica elevada para ceftazidima, como é o caso da KPC-3 (Bush & Bradford, 2020). Isolados que produzem KPC costumam ser resistentes à aminoglicosídeos, pois os EGMs associados ao *bla*_{KPC} costumam carrear genes de resistência a essa classe de antimicrobianos (Kazmierczak *et al.*, 2016; Bush & Bradford, 2020). Inclusive, essa enzima já foi reportada como predominante em amostras clínicas de pacientes com NH no Brasil (Lalaoui *et al.*, 2020).

Outra carbapenemase de preocupação clínica é a NDM. Foi descrita pela primeira vez em 2009, em uma *K. pneumoniae* isolada de um paciente na Suécia que havia sido previamente admitido em hospital na Índia (Bush & Bradford, 2020). Confere resistência a penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, mas não a monobactâmicos (Bush & Bradford, 2020). Atualmente, a enzima é amplamente disseminada no mundo e representa uma preocupação de saúde pública, pois não são inibidas por avibactam ou vaborbactam, limitando ainda mais as opções terapêuticas (Karampatakis *et al.*, 2023). A enzima foi reportada no Brasil em 2013, em *Enterobacterales* e *A. baumannii* (Deglmann *et al.*, 2019). *K. pneumoniae* produtoras da enzima já foram isoladas em amostras clínicas de 8 hospitais em estados do Sul do Brasil (Kazmierczak *et al.*, 2016).

O problema da difusão de enzimas carbapenemases está relacionada ao fato de que os carbapenêmicos costumam ser os antimicrobianos de escolha para tratamento de infecções severas causadas por cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL (Martin & Bachman, 2018).

Além dos meios de aquisição de genes de resistência por transmissão de EGMs, há também a resistência adquirida por mutações genéticas. Em geral, mudanças nos alvos dos antimicrobianos ou em estruturas relacionadas com a entrada e acúmulo dos antimicrobianos na célula bacteriana são os principais mecanismos mutacionais relacionados com a resistência microbiana (Tsai *et al.*, 2011; Goering *et al.*, 2020; Wyres *et al.*, 2020). Como exemplo, alterações na expressão e operação das bombas de efluxo OqxAB e AcrAB da membrana externa de *Klebsiella* spp. conferem resistência a fluoroquinolonas, nitrofurantoína, tigeciclina, cloranfenicol e carbapenêmicos; enquanto mudanças nas porinas OmpK36 e OmpK35 podem colaborar para aumento da resistência à carbapenêmicos (Wyres *et al.*, 2020). Alguns dos genes que podem ser modificados e estão envolvidos com a resistência bacteriana a antimicrobianos podem ser observados na figura 3.

| Mecanismo | Genes | Colistina | Carbapenêmicos | Fluoroquinolonas | Nitrofurantoina | Tigeciclina |
|-------------------------------------|---|-----------|----------------|------------------|-----------------|-------------|
| Modificação de porina | <i>ompK35</i> e <i>ompK</i> | | ■ | | | |
| Modificação do lípidio A | <i>phoPQ</i> , <i>pmrAB</i> , <i>mgrB</i> e <i>ccrAB</i> | ■ | | | | |
| Mutação na topoisomerase | <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> e <i>parE</i> | | | ■ | | |
| Expressão de bomba de efluxo | <i>oqxAB</i> <i>acrAB</i> (<i>ramA</i> , <i>rara</i> , <i>soxS</i> e <i>MarA</i>) | | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Mutação da proteína ribossômica s10 | <i>rpsJ</i> | | | | | ■ |

Figura 3- Relação de core genes envolvidos com a resistência por mutação a antimicrobianos em cepas *Klebsiella pneumoniae* complex. Adaptado de: Wyres L. Kelly e colaboradores.

A resistência antimicrobiana não só reduz drasticamente as opções terapêuticas disponíveis, como também está associada a altas taxas de mortalidade em infecções causadas por patógenos que expressam diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos utilizados como último recurso na prática clínica. E isso atrasa a implementação da antibioticoterapia adequada (Timsit *et al.*, 2014), o que favorece as altas taxas de mortalidade nesse cenário. Isso é crítico principalmente em pacientes imunocomprometidos, pois as taxas de mortalidade aumentam exponencialmente quando esses eventos ocorrem (Zhang *et al.*, 2020).

1.6.4 Variantes fenotípicas em ICS

Como apresentado no item 1.3, o protocolo padrão empregado em todo o mundo para o diagnóstico dos agentes etiológicos das ICS é a cultura, seguido da identificação e antibiograma de um representante de cada morfotipo colonial. No entanto, alguns estudos têm mostrado que cepas com o mesmo morfotipo nas culturas podem apresentar diferentes perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos (Gajic *et al.*, 2022).

A dinâmica sobre como a população de uma espécie bacteriana evolui no hospedeiro ainda é pouco explorada. Abordagens que incluem testes genéticos que testam diferentes colônias crescidas a partir da amostra inicial são efetivas na identificação de diferentes padrões genéticos de uma espécie bacteriana, mas essa prática não é rotina nos laboratórios de microbiologia clínica (Didelot *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2022; Badrane *et al.*, 2023).

Assim como há chance de diferentes cepas colonizando o mesmo hospedeiro coexistirem, a evolução do próprio microrganismo também pode ser possível (Didelot *et al.*,

2016). Em geral, a taxa de substituição por sítio é de 10^{-7} a 10^{-5} por ano em bactérias (Didelot *et al.*, 2016). Em *K. pneumoniae* essa taxa é menor do que a faixa geralmente observada em bactérias, sendo aproximadamente 10 mutações por ano por genoma (Didelot *et al.*, 2016). Mutações pontuais, aquisição de genes através de THG e deleções podem também promover a diversificação de cepas.

Esse fenômeno é denominado aqui como Variante fenotípica (Vf). A diversidade de Vf pode ser induzida por pressão seletiva, como exposição a antibióticos, e essa ocorrência pode culminar em falha terapêutica. Já foi evidenciado que as mutações que conferem resistência podem ocorrer meses após o tratamento com o respectivo antimicrobiano (Didelot *et al.*, 2016).

Esse fenômeno foi evidenciado para *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase em pacientes com ICS, onde foi identificada Vf em cepas isoladas de um mesmo paciente, as quais apresentaram deleções não sinônimas e diferenças quanto a presença de genes que culminaram em fenótipos distintos, tanto de virulência como de resistência aos antimicrobianos (Cheng *et al.*, 2022). A presença de cepas com perfis distintos de suscetibilidade aos antimicrobianos em um mesmo episódio de ICS implica em consequências negativas para a escolha do melhor tratamento desses eventos principalmente em pacientes imunocomprometidos, com grande potencial para culminar na falha terapêutica (Cheng *et al.*, 2022).

2 JUSTIFICATIVA

Pacientes que possuem NH são extremamente suscetíveis ao desenvolvimento de ICS, tanto pela imunossupressão, fruto da doença de base e do tratamento, como pela implementação de dispositivos invasivos para tratamento. Ademais, a colonização do trato gastrointestinal por cepas do KpSC se mostra como uma das condições que estão ligadas à subsequente infecção por esse gênero, além de que infecções por esse complexo são frequentes em indivíduos imunossuprimidos. Em *K. pneumoniae* sabe-se que a resistência antimicrobiana é amplamente difundida, contudo, nas demais espécies do KpSC, o padrão de resistência antimicrobiana e informações referentes aos genes relacionados ainda é pouco explorado.

Além disso, é possível que cepas com diferentes características genéticas e fenotípicas colonizem um mesmo indivíduo simultaneamente. Os possíveis motivos para isso é que a colonização por *Klebsiella* spp. pode ocorrer a partir de diversas fontes. Adicionalmente, é possível que uma cepa evolua em resposta à microbiota do próprio hospedeiro. Tanto a colonização quanto a evolução contribuem para a diversidade fenotípica e genotípica dentro de um indivíduo, mesmo quando as cepas são do mesmo gênero e espécie.

Considerando esse contexto, é plausível supor que os eventos de ICS nessa população podem ser ocasionados por diferentes cepas, ainda que pertencentes a uma mesma espécie sendo possível a existência de subpopulações com diferentes características fenotípicas e genotípicas na mesma ICS. Este contexto mostra a relevância de rever o diagnóstico das ICS em pacientes com NH. Nossas hipóteses são: i) subpopulações com perfis de antibiograma distintos podem ser observadas em um mesmo episódio de infecção, e ii) espécies distintas, mas pertencentes ao KpSC, podem coexistir em um episódio de ICS.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar se subpopulações de *Klebsiella* spp., com perfis de antibiograma distintos, podem coexistir em um mesmo episódio de ICS em pacientes com NH.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar as espécies de *Klebsiella* isoladas de episódios de ICS em pacientes com NH.
- Aferir os perfis de resistência aos antimicrobianos dos microrganismos incluídos na coleção.
- Investigar a presença de genes comumente relacionados à resistência às cefalosporinas de amplo espectro e aos carbapenêmicos, nas amostras que apresentarem esses fenótipos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População do estudo e processamento do material

O material clínico utilizado neste estudo foi proveniente de pacientes diagnosticados com NH e/ou submetidos a TCTH, que estiveram internados na unidade de transplantes (UTX) do hospital terciário Complexo Hospitalar de Niterói (CHN) da região metropolitana do Rio de Janeiro entre setembro de 2020 a dezembro de 2021. Esses pacientes fazem parte de um estudo prospectivo que avalia as complicações infecciosas em pacientes com NH, aprovado pelo respectivo comitê de ética em pesquisa sob o número 54941216.0.3001.5455.

As amostras sanguíneas dos pacientes foram coletadas e processadas pelo laboratório clínico. As placas empregadas para o isolamento a partir das garrafas de hemoculturas foram transportadas sob refrigeração para o Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica da UFRJ, localizado no Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ. As placas recebidas foram inspecionadas e um representante de cada morfotipo colonial observado foi sub cultivado, empregando a técnica de esgotamento, em ágar MacConkey (DIFCO™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), seguido de incubação em

aerobiose a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas, para a obtenção de culturas puras. Então, as cepas foram repicadas a partir do MacConkey em meio nutritivo ágar Tryptic Soy Agar (TSA, DIFCO) e incubadas em aerobiose a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18h-24 horas. Após esse período, foram estocadas a -20°C em criotubos contendo 1 mL de meio crioprotetor *Skim milk* (DIFCO) suplementado com 20% de glicerol, preparado de acordo com as especificações do fabricante.

4.2 Critérios de seleção e processamento das amostras do estudo

O desenho do estudo foi realizado conforme ilustrado na figura 4.

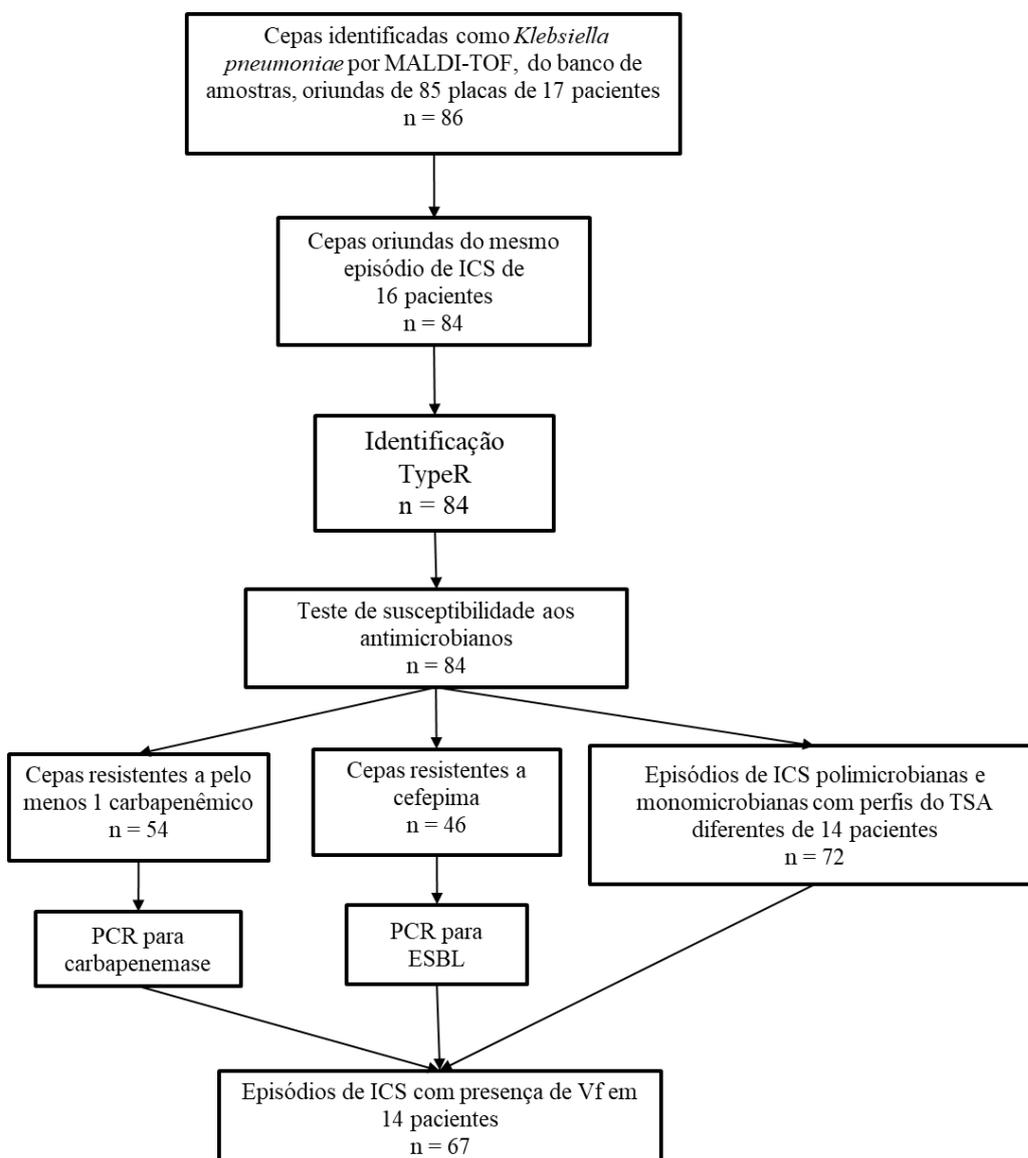


Figura 4 - Desenho do estudo para identificação de espécies do KpSC e Vf coexistindo em episódios de ICS.

O critério de seleção para as amostras do estudo foi de acordo com as seguintes normas: um episódio de ICS compreende o período de 14 dias após a primeira constatação de um

patógeno na corrente sanguínea. Em casos de pacientes que tenham tido o diagnóstico de ICS e o patógeno tenha sido re-isolado no 15º dia após o primeiro dia da confirmação da ICS, foi considerado como novo episódio de ICS. Isolados únicos oriundos de apenas uma placa de hemocultura não foram incluídos nas análises referentes a susceptibilidade antimicrobiana e pesquisa de genes de resistência.

4.3 Identificação bacteriana

A identificação bacteriana foi realizada por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA). As amostras foram reativadas do banco, através do semeio por técnica de esgotamento em meio Trypic Soy Agar (TSA, DIFCO) e incubadas em aerobiose a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 18h-24 horas. Cada amostra foi aplicada em duplicata na placa metálica de 96 poços do equipamento, com auxílio de palito estéril e, então, foi aplicado 1 μl de ácido fórmico. Após a secagem completa, foi aplicado 1 μl de matriz *alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid*- (Bruker Daltonics) (preparado conforme as especificações do fabricante) e a placa foi mantida em temperatura ambiente até a secagem. Os espectros de massas foram colhidos na frequência do *laser* em 60 hz, com captação entre 40-240 disparos. Os espectros gerados foram inicialmente analisados por meio do *software* MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) e interpretados segundo o *score* obtido após a leitura do espectro no aparelho. A faixa do *score* foi interpretada da seguinte forma: 2.00-3.00 a identificação é de grande confiabilidade, entre 1.70-1.99 a identificação é de baixa confiabilidade e entre 0.00-1.69 a identificação não foi possível.

As cepas com identificação do gênero *Klebsiella* spp. tiveram seus espectros salvos e carregados na ferramenta *online* de identificação, TypeR, disponível em: <https://maldityper.pasteur.fr> (Bridel *et al.*, 2021).

4.4 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizado de acordo com as recomendações do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST, 2024). Para preparar o inóculo das amostras de *Klebsiella* spp., foram colocados 3 mL de salina (0,85%) estéril, em tubos previamente autoclavados, e a amostra foi inoculada com auxílio de alça estéril, em câmara de fluxo laminar, até que se obtivesse a turbidez compatível com o tubo 0.5 da escala McFarland. Com auxílio de *swab* estéril, uma alíquota dessa suspensão foi

inoculada em placas de petri de 150x100mm contendo o meio Müller-Hinton (DIFCO™) em ágar, de forma a obter crescimento confluyente. Em seguida, foram aplicados os discos dos antimicrobianos para o teste com auxílio de pinça estéril. Os discos antimicrobianos testados são da marca Cefar® (Cefar Diagnóstica, SP, Brasil) e foram: Amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 µg), piperacilina/tazobactam (30/6 µg), ampicilina/sulbactam (10/10 µg), cefepima (30 µg), ceftazidima (10 µg), cefoxitina (30 µg), cefuroxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ceftalozana/tazobactam (30/10 µg), ceftazidima/avibactam (10/4 µg), aztreonam (30 µg), meropenem (10 µg), ertapenem (10 µg), imipenem (10 µg), amicacina (30 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacino (5 µg), tetraciclina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), fosfomicina (200 µg) e sulfametoxazol/trimetoprima (23,75/1,25 µg).

Para detecção fenotípica de ESBL foi realizado o teste de disco aproximação, em conjunto com o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Para isso, os discos de cefalosporinas (ceftriaxona, cefepima e ceftazidima) foram aplicados a 20 mm do disco de amoxicilina/ácido clavulânico (BrCAST, 2024). O aparecimento de distorções do halo de inibição do crescimento entre os discos contendo o substrato e o inibidor da enzima, ou o aparecimento de zonas fantasmas nessa mesma região caracterizou resultado positivo para a produção de ESBL.

Após aplicação dos discos, as placas de TSA foram incubadas em aerobiose a 35 ± 2 °C por 18 ± 2 horas. A interpretação dos resultados foi feita de acordo com o preconizado pelo BrCAST (BrCAST, 2024) exceto para tetraciclina, que a interpretação foi feita de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2023). As cepas *E. coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 foram utilizadas como controle de qualidade do teste e controle positivo para produção de ESBL, respectivamente (BrCAST, 2024).

4.5 Realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As cepas que apresentaram resistência fenotípica a cefepima e/ou aos carbapenêmicos no TSA foram submetidas à pesquisa dos genes que codificam resistência a esses antimicrobianos. A suspensão para PCR foi composta de 0,5 mL de água Milli-Q em microtubos de centrifugação e uma colônia isolada da amostra previamente semeada em TSA por técnica de esgotamento e incubada em aerobiose a 35 ± 2 °C por 18h-24 horas. Após a inoculação, o *ependorf* foi homogeneizado com o auxílio de vórtex. Para as amostras que

apresentaram resistência à pelo menos um carbapenêmico foi feito PCR *multiplex* para pesquisa de *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*. Quanto às cepas que apresentaram fenótipo de resistência a cefepima foi feito PCR para pesquisa de *bla_{CTX-M-1/2}*. Como controle da amplificação na reação, a pesquisa do gene *rrs* (16S rRNA) foi incluída na PCR *multiplex*.

A mistura da reação foi preparada com master mix (GoTaq® Green Master Mix 2X, - Thermo Fisher, MA, EUA, 13 µL), H₂O livre de DNase (UltraPure™, Thermo Fisher, MA, EUA, 2 µL), *primer forward* (10 pmol/µL, 0,5 µL) e *reverse* (10 pmol/µL, 0,5 µL) para os genes *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}* e *rrs*. A PCR para pesquisa de genes *bla_{CTX-M-1/2}* foi feita com Master mix (GoTaq® Green Master Mix 2X, 5 µL), H₂O livre de DNase (UltraPure™, Thermo Fisher, MA, EUA, 3 µL) e *primer forward* (10 pmol/µL, 0,5 µL) e *reverse* (10 pmol/µL, 0,5 µL). As sequências dos *primers* utilizados estão descritas no quadro 3.

Quadro 3 - *Primers* utilizados na PCR, seus respectivos genes alvo, sequências nucleotídicas e tamanho esperado para o produto.

| Gene | Primer | Sequência (5'-3') | Tamanho esperado do fragmento de amplificação (pares de base) |
|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---|
| <i>bla_{NDM}</i> | <i>bla_{NDM}-F</i> | GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC | 621 |
| | <i>bla_{NDM}-R</i> | CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC | |
| <i>bla_{KPC}</i> | <i>bla_{KPC}-1F</i> | GCT ACA CCT TGC TCC ACC TTC | 800 |
| | <i>bla_{KPC}-3R</i> | TGG AGG GCC AAT AGA TGA TT | |
| <i>bla_{CTX-M-1/2}</i> | <i>bla_{CTX-M-1/2}-F</i> | ATG TGC AGY ACC AGT AA | 512 |
| | <i>bla_{CTX-M-1/2}-R</i> | CGC TGC CGG TTT TAT CSC CC | |
| <i>rrs</i> | 16MS-F | AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG | 1499 |
| | 16MS-R | ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT | |

Então, as misturas foram adicionadas a 2 µl da suspensão da cepa em estudo, e homogeneizado com a pipeta. Os tubos foram encaminhados ao termociclador e o programa de ciclagem da reação *multiplex* desenvolvido *in house* para *bla*_{KPC} (Hossain et al., 2004), *bla*_{NDM} (Poirel et al., 2011) e *rrs* (Mendes et al., 2007) foi: desnaturação inicial a 94°C por 8 minutos, seguido de 30 ciclos que incluem a desnaturação a 94°C por 30 segundos, fase de anelamento a 53°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 40 segundos e, após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final a 72°C por 7 minutos.

O programa de ciclagem utilizado para a PCR voltada para a pesquisa de *bla*_{CTX-M-1/2} (desenho do *primer* e protocolo *in house*) foi: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos que de desnaturação a 95°C por 30 segundos, fase de anelamento a 54°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos. Após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final a 72°C por 8 minutos.

Após a amplificação, foi realizada a eletroforese do fragmento de amplificação. Os tubos foram retirados do equipamento e seu conteúdo aplicado em gel de agarose K9-9500 Kasvi (Laboratórios Conda S.A., Madrid, ES) 1% preparado com adição de 2 µl de brometo de etídio (10mg/ml) em cuba de eletroforese com solução tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X.

Em seguida, a cuba de eletroforese foi ligada em corrente de 100 mA a 100V, por 40-45 minutos. Para realização da leitura, o gel foi exposto à luz ultravioleta no transiluminador ImageQuantTM LAS 4000 (GE HealthCare, Chicago, IL, EUA). Os fragmentos observados tiveram seus tamanhos estimados mediante comparação com o padrão de tamanho molecular 100 pb Ladder Plus (Sinapse Inc., Maranhão, SP) e com os controles da reação. As cepas utilizadas como controle foram a *K. pneumoniae* KP13 MDR para controle do gene *bla*_{KPC} (Ramos *et al.*, 2014) e para o gene *bla*_{NDM} a cepa *K. pneumoniae* ST11 produtora de NDM (Campana *et al.*, 2013). O controle para *bla*_{CTX-M-2} foi a cepa *E. coli* Y15317 (Botelho, 2016).

5 RESULTADOS

Foram analisadas 84 cepas isoladas de 19 episódios de ICS em 16 pacientes. Ao todo, 88,1% (74/84) da coleção foi identificada como *K. pneumoniae*; 7,1% (6/84) como *K. variicola* subsp. *variicola*; 2,4% (2/84) como *K. variicola* subsp. *tropica*; e 2,4% (2/84) como *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*. A distribuição de identificação por MALDI-TOF, empregando ou não o TypeR, em relação à identificação realizada pelo laboratório clínico está apresentada na tabela 1. Das espécies estudadas, 11,9% (10/84) apresentaram resultados divergentes considerando a identificação realizada pelo laboratório clínico e a realizada como parte desse trabalho, empregando MALDI-TOF e os softwares Biotyper e TypeR. Enquanto o laboratório clínico identificou toda a coleção como *K. pneumoniae* por MALDI-TOF, observamos a presença de 10 amostras pertencentes à espécie *K. variicola* quando empregamos MALDI-TOF e o software integrado, Biotyper. Porém, o software TypeR identificou essas 10 amostras como *K. variicola* subsp. *variicola* (n=6), *K. variicola* subsp. *tropica* (n=2) e *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (n=2).

Tabela 1- Identificação do KpSC entre as cepas da coorte.

| Espécie | Identificação laudo (n) | Identificação Biotyper (n) | Identificação TypeR (n) |
|--|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| <i>K. pneumoniae</i> | 84 | 74 | 74 |
| <i>K. variicola</i> | - | 10 | - |
| <i>K. variicola</i> subsp. <i>tropica</i> | - | - | 2 |
| <i>K. variicola</i> subsp. <i>variicola</i> | - | - | 6 |
| <i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> | - | - | 2 |

Foram observados 13 episódios de infecção da corrente sanguínea (ICS) em 10 pacientes causados exclusivamente por *Klebsiella pneumoniae*. Em outros dois episódios de ICS, um foi causado exclusivamente por *Klebsiella variicola* subsp. *variicola*, e em outro paciente por *Klebsiella variicola* subsp. *tropica*. Portanto, as espécies identificadas em ICS

monomicrobianas tiveram a seguinte distribuição: 68,4% (13/19) por *K. pneumoniae*, 5,2% (1/19) por *K. variicola* subsp. *variicola*, 5,2% (1/19) por *K. variicola* subsp. *tropica*, 5,2% (1/19). Em relação às ICS causadas por mais de uma espécie, foram identificados 4 episódios em 4 pacientes. As espécies identificadas nos episódios polimicrobianos foram *K. pneumoniae*, *K. variicola* subsp. *variicola* e *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*. A combinação das espécies identificadas em cada um desses episódios está resumida na figura 5. *K. pneumoniae* e *K. variicola* subsp. *variicola* coexistiram em 2 episódios; *K. pneumoniae*, *K. variicola* subsp. *variicola* e *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* em 1 episódio; e *K. pneumoniae* e *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* em 1 episódio.

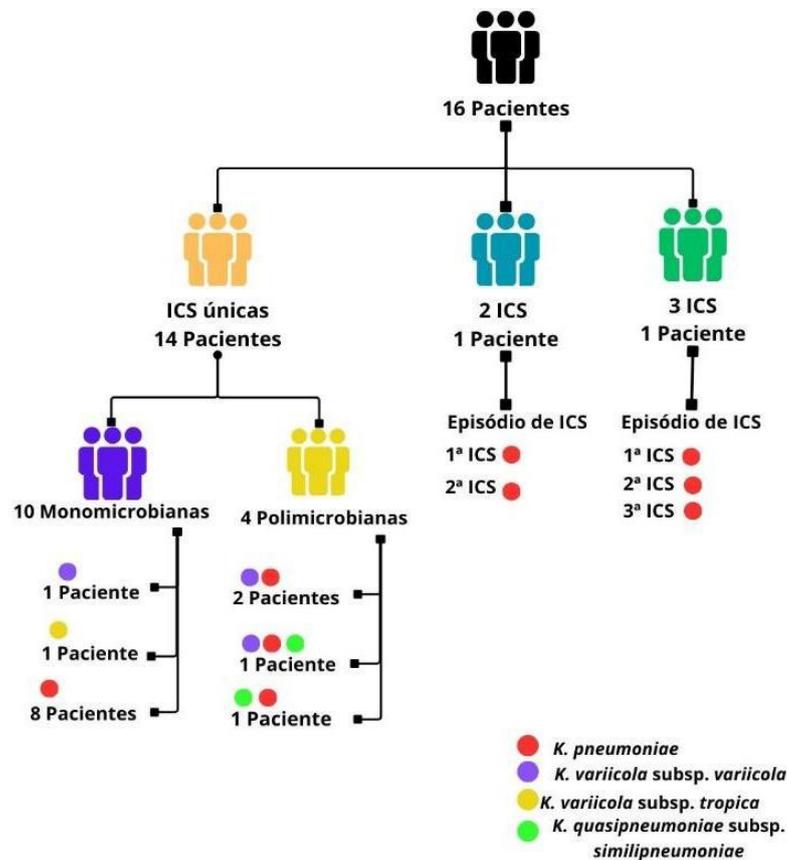


Figura 5- Distribuição das espécies do KpSC nos episódios de ICS dos pacientes do estudo.

As maiores taxas de resistência foram observadas para fosfomicina, com 77% (65/84), seguida por piperacilina-tazobactam, 58,3% (49/84); cefuroxima, 57,1% (48/84); ceftazidima, 55,9% (47/84); aztreonam, 54,7% (46/84); cefepima, 54,7% (46/84); ceftriaxona, 54,7% (46/84); cefoxitina, 54,7% (46/84); ciprofloxacina, 52,3% (44/84); sulfametoxazol-trimetoprima, 52,3% (44/84); ceftalozane-tazobactam, 51,1% (43/84); imipenem, 51,1%

(43/84); meropenem, 58,1% (43/74); cloranfenicol, 52,7% (39/74); tetraciclina, 36,4% (27/74); amicacina, 16,2% (12/74); gentamicina, 1,3% (1/74); e ceftazidima-avibactam, 0% (0/84). A resistência observada foi mais frequente em *K. pneumoniae* do que nas demais espécies identificadas, como evidenciado na tabela 2.

Tabela 2 - Porcentagem de resistência observada de cada espécie do KpSC para cada antimicrobiano do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.

| Antimicrobiano | <i>K. pneumoniae</i> (n = 74) | <i>K. variicola</i> subsp. <i>variicola</i> (n= 6) | <i>K. variicola</i> subsp. <i>tropica</i> (n= 2) | <i>K.</i> <i>quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> (n = 2) |
|---------------------------------|----------------------------------|---|--|---|
| Fosfomicina | 78,3% (58) | 66,6% (4) | 50% (1) | 100% (2) |
| Piperacilina-tazobactam | 66,2% (49) | - | - | - |
| Cefuroxima | 64,8 % (48) | - | - | - |
| Ceftazidima | 63,5% (47) | - | - | - |
| Aztreonam | 62,1% (46) | - | - | - |
| Cefepima | 62,1% (46) | - | - | - |
| Ceftriaxona | 62,1% (46) | - | - | - |
| Cefoxitina | 62,1% (46) | - | - | - |
| Ciprofloxacina | 59,4% (44) | - | - | - |
| Sulfametoxazol- trimetoprima | 59,4% (44) | - | - | - |
| Imipenem | 58,1% (43) | - | - | - |
| Meropenem | 58,1% (43) | - | - | - |
| Cloranfenicol | 52,7% (39) | - | - | - |
| Ceftalozane-tazobactam | 51,1% (43) | - | - | - |
| Tetraciclina | 36,4% (27) | - | - | - |
| Amicacina | 16,2% (12) | - | - | - |
| Gentamicina | 1,3% (1) | - | - | - |
| Ceftazidima-avibactam | - | - | - | - |

“-” Representa ausência de cepas resistentes ao respectivo antimicrobiano, ou 0%.

Os fenótipos sugestivos de produção de ESBL foram pesquisados nas 84 cepas do estudo. Uma única cepa apresentou resultado positivo, pertencente a espécie *K. pneumoniae*, enquanto que 52,3% (44/84) apresentaram resultados inconclusivos, ou seja, não foi observado qualquer halo de inibição aos antimicrobianos empregados no teste; e 46,4% (39/84) apresentaram resultados negativos.

Devido ao grande número de resultados inconclusivos observados nos testes fenotípicos para a detecção de ESBL, todas as cepas que apresentaram resistência à cefepima foram submetidas à pesquisa do gene codificador de ESBL *bla_{CTX-M-1/2}*. Das 46 cepas testadas, 34% (16/46) das cepas foram positivas para a presença do gene. Cepas que apresentaram resistência a pelo menos um carbapenêmico foram submetidas à pesquisa do gene codificador de carbapenemase *bla_{KPC}* e, das 57 cepas testadas, 43 (75,4%) foram positivas para a presença do gene. Ainda, 13 cepas foram positivas para a presença de ambos os genes, *bla_{KPC}* e *bla_{CTX-M-1/2}*. Todos os genes de resistência foram detectados somente em *K. pneumoniae*. Todas as cepas da coorte foram negativas para o gene *bla_{NDM}*.

A presença de cepas com diferentes perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos e que variaram na presença de genes. Foram observados 23 perfis de resistência diferentes para *K. pneumoniae*, e 1 perfil de resistência para espécies de *K. variicola* subsp. *variicola*, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* e *K. variicola* subsp. *tropica* como disposto na tabela 4. A distribuição das Vf por casos pode ser observada na tabela 5.

Os casos dos pacientes P25, P51, P62, P59, P39, P40, P54 e P17 foram causados por Vf com susceptibilidade variável somente para fosfomicina. Os mais notáveis para análise foram P20, P25, P34, P45, P61 e P63, casos de cepas com resistência a mais de duas classes de antimicrobianos. Identificamos que, em um caso, cepas que apresentavam genes de resistência aos betalactâmicos coexistiam com cepas que não possuíam esses genes mas que também eram resistentes à grande dos antimicrobianos testados, como observado na 1^o ICS do paciente P34. A variação de susceptibilidade entre as cepas de um mesmo episódio foi observada para amicacina, ciprofloxacina, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprima e fosfomicina. No paciente P20, na 2^o ICS, foi identificado o gene *bla_{KPC}* em todas as cepas, enquanto na 3^o ICS desse paciente identificamos os genes de resistência *bla_{CTX-M-1/2}* e *bla_{KPC}* nas cepas. Todas as cepas de ambos episódios apresentaram resistência às cefalosporinas de 3^a e 4^a geração, carbapenêmicos, monobactâmico, penicilinas, ciprofloxacina e cloranfenicol. A variação da susceptibilidade na 2^a ICS ocorreu para amicacina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprima, na 3^a a variação ocorreu para fosfomicina e sulfametoxazol-trimetoprima. No

caso do P25, foram observados dois perfis de resistência, onde todas as cepas se mostraram resistentes a cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, monobactâmico, penicilinas, ciprofloxacina, tetraciclina e cloranfenicol, e apresentaram variações de susceptibilidade para fosfomicina. O gene *bla*_{CTX-M-1/2} foi positivo em ambas as cepas isoladas do paciente P25. No caso do P34, em ambos episódios de ICS observados, todas as cepas apresentaram resistência a cefalosporinas de 3º e 4º geração, monobactâmico, penicilinas, carbapenêmicos, ciprofloxacina e tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima, com variações de susceptibilidade para cloranfenicol, ceftalozane-tazobactam e amicacina. Entre os perfis da 1ª ICS, três continham cepas com diferenças genéticas, cepas que possuíam os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{KPC} e *bla*_{CTX-M-1/2} ou não possuíam nenhum dos dois. No caso do P45, foram observados dois perfis de resistência, sendo a resistência às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, monobactâmico, carbapenêmicos, amicacina, fosfomicina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprima comum a todas cepas, com variações de susceptibilidade para ciprofloxacina. No caso do P61, foram observados dois perfis de resistência, ambos apresentaram resistência a cefalosporinas de 3º e 4º geração, monobactâmico, penicilinas, ciprofloxacina, fosfomicina, tetraciclina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprima, com variações de susceptibilidade para amicacina. O caso do P63 é o mais notório, pois as cepas isoladas apresentaram padrões de susceptibilidade e genéticos muito distintos, ambas as cepas apresentaram resistência à cefoxitina, ciprofloxacina, fosfomicina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima, e uma das cepas foi positiva para o gene *bla*_{CTX-M-1/2} e apresentava resistência aos betalactâmicos, cloranfenicol e à gentamicina.

Foram identificadas 18 cepas do KpSC em 4 episódios de ICS únicas polimicrobianas de 4 pacientes. 12, 4 e 2 eram *K. pneumoniae*, *K. variicola* subsp. *variicola* e *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* respectivamente. A distribuição das espécies por paciente pode ser observada na tabela 3. Nenhuma das cepas apresentaram fenótipo sugestivo de ESBL e foram negativas para a presença dos genes pesquisados. Somente a variação da resistência foi evidenciada. Em 3 episódios de ICS houveram variações somente quanto à fosfomicina, no caso do paciente P3 foi observada variação para fosfomicina, ertapenem e piperacilina-tazobactam.

Tabela 3 - Casos de ICS polimicrobianas por KpSC e perfil de resistência aos antimicrobianos.

| Paciente | Espécie | N | Perfil de resistência |
|----------|--|---|---|
| P3 | <i>K. pneumoniae</i> | 4 | FOS (1) FOS, PPT (2) FOS, ETP (1) |
| | <i>Klebsiella</i> subsp. <i>variicola</i> | 1 | - |
| P39 | <i>K. pneumoniae</i> | 3 | FOS (1) - |
| | <i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> | 1 | FOS (1) |
| | <i>K. variicola</i> subsp. <i>variicola</i> | 1 | FOS (1) |
| P40 | <i>K. pneumoniae</i> | 4 | FOS (3) - |
| | <i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> | 1 | FOS (1) |
| P54 | <i>K. pneumoniae</i> | 1 | FOS (1) |
| | <i>K. variicola</i> subsp. <i>variicola</i> | 2 | FOS (1) - |

“-“ Representa sem resistência aos antimicrobianos testados. FOS = fosfomicina. PPT = Piperacilina-tazobactam. ETP = Ertapenem.

Tabela 4 – Perfis de resistência observados nas cepas da coorte.

| Espécie | N (84) | Perfis de resistência |
|-----------------------------------|--|--|
| <i>K. pneumoniae</i> ¹ | 3 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, FOS, C/T, CLO, SUT, TET, AMI |
| | 5 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, FOS, C/T, CLO, AMI, SUT |
| | 1 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, FOS, CLO, SUT, TET, AMI |
| | 7 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, FOS, TET, SUT, C/T, CLO |
| | 1 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, FOS, TET, SUT, C/T, AMI |
| | 2 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, FOS, TET, CLO, SUT |
| | 1 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, FOS, TET, CLO, SUT, AMI |
| | 1 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, FOS, SUT, AMI |
| | 1 | CFO, CRO, CPM, ATM, ETP, GEN, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, FOS, TET, CLO, SUT |
| | 2 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, FOS, TET, CLO, SUT |
| | 9 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, FOS, CLO, SUT |
| | 5 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, FOS, TET, SUT, C/T |
| | 2 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, PPT, CAZ, CFX, C/T, FOS, CLO, SUT, AMI |
| | 2 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, FOS, CLO, AMI |
| | 1 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, FOS |
| 1 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, CLO | |

| | | |
|--|----|--|
| | 1 | CRO, CPM, ATM, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, FOS, TET, CLO, SUT |
| | 1 | CFO, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, FOS, TET, CLO, SUT, AMI |
| | 1 | CRO, CPM, ATM, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, TET, CLO, SUT |
| | 1 | CFO, CIP, CFX, FOS, TET, SUT |
| | 1 | ETP, FOS |
| | 2 | PPT, FOS |
| | 10 | FOS |
| | 13 | - |
| <i>K. variicola</i> subsp. <i>variicola</i> ² | 4 | FOS |
| | 2 | - |
| <i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> | 2 | FOS |
| <i>K. variicola</i> subsp. <i>tropica</i> ³ | 1 | FOS |
| | 1 | - |

CFO = Cefoxitina, CRO = Ceftriaxona, CPM = Cefepima, ATM = Aztreonam, MER = Meropenem, IPM = Imipenem, ETP = Ertapenem, ASB = Ampicilina-sulbactam, CIP = Ciprofloxacina, PPT = Piperacilina-tazobactam, CAZ = Ceftazidima, CFX = Cefuroxima, FOS = Fosfomicina, C/T = Ceftolozane-tazobactam, CLO = Cloranfenicol; SUT = Sulfametoxazol-trimetoprima, TET = Tetraciclina, AMI = Amicacina, GEN = Gentamicina. ¹-13 cepas de *Klebsiella pneumoniae* que não apresentaram perfil de resistência infectaram pacientes simultaneamente a outras cepas que apresentavam perfil de resistência. ²- Duas cepas de *K. variicola* subsp. *variicola* que não apresentaram perfil de resistência, infectaram pacientes simultaneamente a outras cepas que apresentavam perfil de resistência. ³- Uma cepa de *K. variicola* subsp. *tropica* que não apresentou perfil de resistência, infectou paciente simultaneamente a outra cepa que apresentava resistência.

Tabela 5- Perfis de resistência aos antimicrobianos, fenótipo ESBL e genes codificadores de betalactamases observados nas cepas isoladas de cada episódio de ICS nos pacientes hematológicos. As discrepâncias do antibiograma das cepas de um mesmo episódio de ICS estão ressaltadas em vermelho.

| Paciente | ICS | Espécie(s) isoladas | N (67) | Perfis de resistência aos antimicrobianos (n) | Fenótipo de ESBL/ Genes de resistência |
|----------|-------|----------------------|--------|--|--|
| P20 | 2ª | <i>K. pneumoniae</i> | 5 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, AMI , FOS, CLO , SUT (1) | Inconclusivo / <i>bla</i> _{KPC} (5) |
| | | | | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, AMI , FOS, CLO (2) | |
| | | | | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, AMI , FOS, SUT (1) | |
| | | | | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, FOS (1) | |
| P20 | 3ª | <i>K. pneumoniae</i> | 5 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, CLO (1) | Inconclusivo / <i>bla</i> _{KPC} (1) |
| | | | | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, CLO , FOS , SUT (4) | Inconclusivo / <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{CTX-M-1/2} (4) |
| P25 | Única | <i>K. pneumoniae</i> | 2 | CRO, CPM, ATM, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, TET, CLO , SUT , FOS (1) | Negativo / <i>bla</i> _{CTX-M-1/2} (1) |

| | | | | | |
|-----|----------------|----------------------|--|---|---|
| | | | CRO, CPM, ATM, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, TET, CLO, SUT (1) | Inconclusivo / <i>bla</i> _{CTX-M-1/2} (1) | |
| P34 | 1 ^a | <i>K. pneumoniae</i> | 14 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, FOS, TET, SUT, AMI , CLO (1) | Inconclusivo / <i>bla</i> _{KPC} (12) |
| | | | | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, FOS, TET, SUT, AMI , C/T (1) | |
| | | | | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, FOS, TET, SUT, AMI , C/T , CLO (3) | |
| | | | | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, FOS, TET, SUT, C/T , CLO (7) | |
| | | | | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, FOS, TET, SUT, C/T (1) | |
| | | | CFO, ETP, AMI , ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, FOS, TET, CLO , SUT (1) | Negativo / Negativo (1) | |
| P45 | Única | <i>K. pneumoniae</i> | 3 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, FOS, TET, SUT, CLO (2) | Inconclusivo / <i>bla</i> _{KPC} (6) |
| | | | | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, FOS, TET, SUT (4) | |
| | | | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, AMI , ASB, PPT, CAZ, CFX, C/T, FOS, CLO , SUT, CIP (1) | Inconclusivo / <i>bla</i> _{KPC} (3) | |

CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ETP, AMI, ASB, PPT, CAZ, CFX, C/T, FOS, CLO, SUT (2)

| | | | | | |
|-----|-------|--|---|---|--|
| P51 | Única | <i>K. pneumoniae</i> | 3 | FOS (2) | Negativo / Negativo (3) |
| | | | | - | |
| P61 | Única | <i>K. pneumoniae</i> | 3 | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, FOS, TET, CLO, SUT, AMI (1) | Inconclusivo / <i>bla</i> _{KPC} (3) |
| | | | | CFO, CRO, CPM, ATM, MER, IPM, ASB, CIP, PPT, CAZ, CFX, C/T, FOS, TET, CLO, SUT (2) | |
| P62 | Única | <i>K. pneumoniae</i> | 6 | FOS (1) | Negativo / Negativo (6) |
| | | | | - | |
| P63 | Única | <i>K. pneumoniae</i> | 2 | CFO, CIP, CFX, FOS, TET, SUT, CRO, CPM, ATM, ETP, GEN, ASB, PPT, CAZ, C/T, CLO (1) | Positivo / <i>bla</i> _{CTX-M-1/2} (1) |
| | | | | CFO, CIP, CFX, FOS, TET, SUT (1) | Negativo / Negativo (1) |
| P59 | Única | <i>K. variicola</i> subsp. <i>tropica</i> | 2 | FOS (1) | Negativo / Negativo (2) |
| | | | | - | |
| P3 | Única | <i>K. pneumoniae</i> | 4 | FOS (1) | Negativo / Negativo (4) |
| | | | | FOS, PPT (1) | |

| | | | | | |
|-----|-------|--|---|--------------|-------------------------|
| | | | | FOS, PPT (1) | |
| | | | | FOS, ETP (1) | |
| P39 | Única | <i>K. pneumoniae</i> | 3 | FOS (1) | Negativo / Negativo (3) |
| | | | | - | |
| P40 | Única | <i>K. pneumoniae</i> | 4 | FOS (3) | Negativo / Negativo (4) |
| | | | | - | |
| P54 | Única | <i>K. variicola</i> subsp. <i>variicola</i> | 2 | FOS (1) | Negativo / Negativo (2) |
| | | | | - | |
| P17 | Única | <i>K. pneumoniae</i> | 3 | FOS (1) | Negativo / Negativo (2) |
| | | | | - | |

“-“ Sem resistência aos antimicrobianos testados. CFO = Cefoxitina, CRO = Ceftriaxona, CPM = Cefepima, ATM = Aztreonam, MER = Meropenem, IPM = Imipenem, ETP = Ertapenem, ASB = Ampicilina-sulbactam, CIP = Ciprofloxacina, PPT = Piperacilina-tazobactam, CAZ = Ceftazidima, CFX = Cefuroxima, FOS = Fosfomicina, C/T = Ceftolozane-tazobactam, CLO = Cloranfenicol; SUT = Sulfametoxazol-trimetoprima, TET = Tetraciclina, AMI = Amicacina, GEN = Gentamicina.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo analisamos 19 episódios de ICS em 16 pacientes com neoplasias hematológicas. Parte dos episódios eram monomicrobianos ou polimicrobianos incluindo *K. pneumoniae* e outras espécies do KpSC, o que não foi identificado pelo laboratório clínico. Evidenciamos a presença de Vf em grande parte dos episódios de ICS analisados, sobretudo aqueles causados por *K. pneumoniae*, cuja variação ocorreu principalmente para amicacina, cloranfenicol, ceftalozane-tazobactam, fosfomicina e sulfametoxazol-trimetoprima. Tais achados podem ter implicações importantes no manejo dessas infecções tendo em vista a possibilidade de falha terapêutica.

As espécies identificadas no presente estudo foram majoritariamente compostas por *K. pneumoniae*, as demais representantes do KpSC em nossa coorte foram menos incidentes, o que não é algo inesperado. Maatallah e colaboradores (2014) e Saxenborn e colaboradores (2021), ao estudarem ICS por KpSC em adultos admitidos em hospitais na Suécia noruegueses, também observaram a predominância de *K. pneumoniae*, seguido de *K. variicola* e *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*. A maior detecção de *K. pneumoniae* causando as infecções observadas no estudo, em comparação com as demais espécies, é semelhante a identificação de estudo realizado por Medina e colaboradores em 2024, onde identificaram que *K. pneumoniae* estava mais associada à ICS do que as outras espécies do KpSC (Medina *et al.*, 2024). A importância da identificação correta das cepas não pode ser ignorada, uma vez que o impacto clínico quanto a mortalidade dessas infecções e as características das cepas, quanto à resistência antimicrobiana e virulência, por exemplo, ainda não são bem descritos na literatura. Apenas alguns estudos como de Fostervold e colaboradores em 2024 e Maatallah e colaboradores em 2014 exploraram a significância associada às infecções causadas por espécies do KpSC, algumas associadas a alta mortalidade como *K. variicola* e *K. quasipneumoniae* por exemplo, identificadas inicialmente como *K. pneumoniae* (Maatallah *et al.*, 2014; Fostervold *et al.*, 2024). O estudo de Voellmy e colaboradores em 2022 reforça que a subnotificação dos casos de infecções por KpSC e a identificação errônea são devido à desatualização do *software* do Biotyper nos laboratórios clínicos (Voellmy *et al.*, 2022). Esses achados reforçam a importância da identificação precisa de KpSC para a melhor compreensão dos fatores relacionados com as infecções e seus prognósticos.

Em nosso estudo, o resultado obtido ao identificar espécies que eram *K. pneumoniae* foi igual em ambos *softwares*, Biotyper e TypeR. A identificação em *K. variicola* pelo Biotyper

foi reclassificada nas diferentes espécies, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* e *K. variicola* subsp. *tropica* e *K. variicola* subsp. *variicola* quando o software TypeR foi empregado. Isso provavelmente ocorreu porque o sistema do Biotyper MALDI-TOF-MS atualmente não possui essas espécies e subespécies em seu banco de dados (Bridel *et al.*, 2021). No presente estudo a taxa de identificação para a espécies do KpSC foi mais acurada do que as relatadas na literatura sendo de 88,1% com correção para 11,9%, no estudo de Saxenborn e colaboradores, a taxa de identificação foi correta para 60,9% das espécies que realmente eram *K. pneumoniae* e de 39% para as que eram de outras espécies do KpSC (Saxenborn *et al.*, 2021). E no estudo por Maatallah e colaboradores em 2014, também houve taxa de identificação semelhante a citada, 30% das espécies do KpSC foram identificadas primeiramente como *K. pneumoniae* e posteriormente identificadas como *K. variicola* e *K. quasipneumoniae*, quando estudos genômicos foram realizados (Maatallah *et al.*, 2014). Em suma, as limitações atribuídas à capacidade do *software* atual mascaram a significância real da distribuição de espécies do KpSC nos isolados clínicos, principalmente devido à incapacidade do *software* implementado no método de identificação do MALDI-TOF-MS em identificar todas as espécies desse complexo (Bridel *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2018; Saxenborn *et al.*, 2021).

Os seis casos de ICS causadas por espécies do KpSC eram majoritariamente polimicrobianas. Casos de cepas do KpSC coexistindo em ICS já foram relatados na literatura. Em artigo de Li e colaboradores (2021), na China, foi detectada *K. pneumoniae* e *K. variicola*, onde essa última não foi identificada previamente pelo laboratório clínico, assim como no presente trabalho (Li *et al.*, 2021). Em um caso relatado por Garza-Ramos e colaboradores (2016), uma cepa de *K. variicola* foi identificada como *K. pneumoniae* com perfil susceptível aos antimicrobianos. Nesse estudo, os autores indicam que embora a *K. variicola* não tivesse resistência aos antimicrobianos identificadas, a mortalidade da espécie pode ser determinante no curso da infecção, e que devido a isso é relevante a identificação e diferenciação dessas espécies do KpSC (Garza-Ramos *et al.*, 2016). Pode ser observado que houve tanto espécies de *K. variicola* quanto de *K. quasipneumoniae* nas ICS relatadas do presente estudo, seja em ICS monomicrobiana ou polimicrobianas, não identificadas pelo laboratório clínico. Isso aconteceu porque o laboratório clínico detectou a bactéria e identificou erroneamente como *K. pneumoniae* ou não detectou-a. A primeira justificativa está relacionada ao método de identificação disponível, a segunda abrange mais questões em relação ao método de isolamento e identificação empregado na clínica atualmente. No Brasil, esse método está de acordo com o

procedimento padrão de isolamento microbiológico padronizado pela Anvisa (Anvisa, 2022) no módulo 4, seção 5.3:

“Observar se a cultura é pura ou se existem diferentes tipos de colônias, nesse caso, se há predomínio de um tipo e dependendo da topografia se o agente pode ser considerado potencial patógeno ou contaminante.” (Anvisa, 2022, p. 68).

Esse ponto inclui análise visual do microbiologista responsável por processar as amostras, portanto deixa a nível da probabilidade a seleção e identificação de espécies do KpSC, caso coinfetem um indivíduo em um episódio de ICS, uma vez que não há como discernir visualmente através dos morfotipos as espécies do KpSC. Além disso, existem chances de o patógeno sequer ser isolado. Como resultado dessa padronização, o microbiologista responsável pelo processamento observa somente um morfotipo, isola a colônia sem mais critérios padronizados de seleção da mesma. A Anvisa pontua que é necessário fazer o isolamento dos diferentes morfotipos, além de elencar a necessidade de quais crescimentos devem ser valorizados. Fora isso, não há mais especificações em relação aos critérios da cultura crescida a partir do material sanguíneo. Isso influencia diretamente na identificação e testes subsequentes a serem realizados após a etapa de identificação e conseqüentemente afeta o tratamento do paciente. O caso clínico do estudo de Li e colaboradores em 2021, é um exemplo do que pode gerar a identificação e isolamento errôneo do agente etiológico envolvido na infecção, que pode culminar para o tratamento falho e possibilidade do pior desfecho clínico. Na população do presente estudo, que já apresenta um sistema imunológico pouco eficaz, quaisquer eventos como identificação errônea que culminem na possibilidade de tratamento falho devem ser observados com cuidado.

A taxa de susceptibilidade geral para as cepas do presente estudo foi mais variável para *K. pneumoniae* do que para as demais espécies do KpSC. As cepas identificadas como *K. pneumoniae* apresentaram resistência principalmente à fosfomicina, betalactâmicos, sulfametoxazol-trimetoprima e cloranfenicol, enquanto as demais cepas do KpSC apresentaram resistência somente contra fosfomicina, e os genes de resistência só foram encontrados em *K. pneumoniae*. O padrão de resistência observado pode estar relacionado a epidemiologia local, mas os relatos dos isolados clínicos do KpSC identificados na literatura não apresentam altas taxas de resistência. O estudo conduzido por Yang e colaboradores em 2024 em Hong Kong, com diferentes pacientes acometidos por ICS, observou que *K. pneumoniae* e KpSC foram suscetíveis à maioria dos antibióticos testados, incluindo carbapenêmicos, polimixinas, tigeciclina, cloranfenicol e ciprofloxacina (Yang *et al.*, 2024). Essa diferença na resistência

observada é principalmente devido à epidemiologia local, uma vez que a resistência aos carbapenêmicos é rara em Hong Kong. (Yang *et al.*, 2024). Evidência que se perpetua em estudo por Voellmy em 2022, na Suécia, que relatou que cepas de *K. variicola* são mais suscetíveis, em relação às outras espécies do KpSC, aos antimicrobianos como ciprofloxacina, gentamicina, cefalosporinas e sulfametoxazol-trimetoprima (Voellmy *et al.*, 2022). Em estudo realizado por Sękowska e colaboradores em 2024 na Polônia, genes associados à resistência antimicrobiana em KpSC foram pesquisados de amostras clínicas de diversos pacientes e identificaram que esses genes estavam majoritariamente associados à *K. pneumoniae* (Sękowska, 2024). Ainda, o estudo de Voellmy e colaboradores em 2022, relata que a identificação da incidência da resistência antimicrobiana identificada no KpSC é afetada pela não diferenciação das espécies pelos laboratórios clínicos (Voellmy *et al.*, 2022). Apesar dessa menor incidência em KpSC, estudos com longos recortes temporais sugerem haver uma tendência crescente de isolamento dessas espécies com atributos de resistência e virulência (Medina *et al.*, 2024). Como já relatado por Breurec e colaboradores em 2016, após identificarem infecção em paciente de 65 anos por *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* que apresentava características proeminentes de virulência (Breurec *et al.*, 2016). Em *K. variicola*, tem sido cada vez mais destacada a patogenicidade e virulência, sendo reconhecido como um patógeno com potencial para causar infecções da corrente sanguínea (ICS), com altas taxas de mortalidade já observadas (Medina *et al.*, 2019). No estudo de Yang *et al.* (2019), também foi observado que o aumento da virulência em *K. pneumoniae* pode ser mediado por plasmídeos conjugativos (Yang *et al.*, 2019).

Das cepas analisadas que foram identificadas como Vf, em 16 episódios de ICS, foi observada a variação a mais de três classes diferentes de antimicrobianos, sendo os antimicrobianos cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprima, amicacina, fosfomicina, ceftalozane-tazobactam e ciprofloxacina. Os casos dos pacientes P20, P34 e P45, com cepas positivas para o gene *bla_{KPC}*, foram onde as Vf tiveram susceptibilidade variável para amicacina, sulfametoxazol-trimetoprima, fosfomicina e cloranfenicol. Pode-se notar que a resistência para os demais antimicrobianos continuou semelhante entre as cepas onde não foi detectado o gene, o que pode ser indicativo de outros mecanismos ou genes de resistência associados a essas cepas. Tal padrão de variação de resistência pode estar relacionado às cepas positivas para *bla_{KPC}* que foram detectadas nesses episódios. Em estudo elaborado por Stohr e colaboradores em 2020, observaram que existem variações entre plasmídeos de cepas produtoras de *bla_{KPC}* colonizadoras do trato gastrointestinal em pacientes, com perdas de

plasmídeos entre as cepas isoladas do mesmo paciente, por exemplo que ainda se mantinham resistentes à maioria dos antimicrobianos mesmo após perda de plasmídeos inteiros, porque possuíam outros plasmídeos em seu genoma que conferiam resistência (Stohr *et al.*, 2020). Foi observado que essa perda de plasmídeos poderia ou não mudar o fenótipo de resistência da célula, porque as cepas observadas possuíam mais de 1 plasmídeo de resistência (Stohr *et al.*, 2020). Essa característica não possui evidência genética em nosso estudo, porém nas cepas dos casos citados, a maioria das Vf ainda apresentavam resistência aos betalactâmicos. Apenas um caso é menos sugestivo desse fenômeno, do paciente P63, onde duas cepas com perfis de resistência diferentes foram identificadas, por uma possuir o gene *bla*_{CTX-M-1/2}. Nesse mesmo estudo de Stohr, foi observado que a transferência de plasmídeos de resistência acontece entre *K. pneumoniae in vivo*. Outro estudo realizado por Cheng e colaboradores em 2022 também propõe que a variação genética entre cepas de *K. pneumoniae* pode ocorrer em ICS (Cheng *et al.*, 2022).

Os casos das Vf onde a variação ocorreu somente para fosfomicina foram observados em *K. pneumoniae*, *K. variicola* subsp. *variicola* e *K. variicola* subsp. *tropica*. Os estudos de Lee e colaboradores em 2016 e de Chen e colaboradores em 2020 ressaltam que tal ocorrência pode estar associada ao gene *fosA* e que esse gene costuma estar associado à plasmídeos que também carregam genes que codificam a ESBL CTX-M (Y. Chen *et al.*, 2020). Além disso, *fosA* também já foi descoberto em plasmídeos isolados que não necessariamente codificam CTX-M (Lee *et al.*, 2016; Y. Chen *et al.*, 2020). Considerando os casos da 2° ICS dos pacientes P20, 1° e 2° ICS do P34, P45 e P61 todas as cepas que apresentaram resultado inconclusivo para o teste fenotípico de ESBL e foram negativos para *bla*_{CTX-M-1/2}, apresentaram resistência à fosfomicina. Talvez outros genes codificadores de CTX-M estejam associados à cepa, e que a frequente resistência à fosfomicina esteja diretamente ligada a esse fator. Tanto as cepas de *K. pneumoniae* quanto do KpSC na coorte apresentaram resistência ao antimicrobiano fosfomicina. Na coorte do estudo não há evidência genotípica para tal, contudo, há a possibilidade de essa ser a justificativa para o padrão de resistência observado, uma vez que o gene *fosA* pode ser encontrado no KpSC e em *Enterobacterales* conferindo resistência à fosfomicina (Zurfluh *et al.*, 2020). Outro indicativo para tal resistência, incluindo as cepas em que a variação ocorreu apenas para fosfomicina, é que variações do gene *fosA* podem estar presentes no genoma de *K. pneumoniae* (Kieffer & Guzmán-Puche, 2024). Porém, embora a cepa apresente o gene, a expressão do mesmo fica condicionado à aquisição de promotores que podem provocar o fenótipo de resistência nestas cepas (Kieffer & Guzmán-Puche, 2024).

Ademais esse padrão de resistência pode estar atrelado à questões epidemiológicas, pois enquanto a resistência identificada contra fosfomicina foi elevada nas cepas da presente coorte, em estudo de Sękowska e colaboradores em 2024, na Polônia, que avaliou a susceptibilidade do KpSC à fosfomicina, relatou uma susceptibilidade a essa droga de 62% nas espécies do complexo (Sękowska, 2024).

Foram observados 3 episódios de ICS por Vf com diferentes genes de resistência ou coexistindo com cepas que não apresentavam os genes pesquisados. Nos pacientes P20 na 3ª ICS, com cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC e cepas coprodutoras tanto de KPC quanto de CTX-M-1/2 coexistindo. No caso do P34, onde houve identificação de três perfis de Vf, sendo os perfis genéticos de produção somente de KPC, coprodução de KPC e CTX-M-1/2 e sem genes de resistência pesquisados presentes. E no caso do P63, onde foram isoladas cepas com perfis totalmente distintos, sendo um com produção de CTX-M-1/2 e outro não. Os estudos genômicos por Cheng e colaboradores em 2022 e Wyres e colaboradores em 2021 já exploraram a diversidade genética de espécies de *K. pneumoniae* em amostras clínicas (Wyres *et al.*, 2021; Cheng *et al.*, 2022). Os casos dos pacientes P20 e P34 tinham em comum a presença de cepas produtoras de KPC, com diversas variações à susceptibilidade aos antimicrobianos e à presença de *bla*_{KPC}. No estudo de Cheng e colaboradores em 2022 na Pensilvânia, foi hipotetizado que cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase apresentam grande diversidade fenotípica e genotípica em ICS de um único hospedeiro (Cheng *et al.*, 2022). Naquele estudo, foi descoberto a variação genotípica de genes de resistência como *bla*_{KPC-1}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *fosA6*, *tet(A)* (Cheng *et al.*, 2022). Em nosso estudo também identificamos variações aos antimicrobianos, que podem estar associadas à variação ou não dos genes, que poderia ser indicativo do mesmo fenômeno descrito por Cheng e colaboradores. O fenômeno das Vf que foram observados nesse estudo, pode estar associada à espécie onde esse fenômeno foi mais incidente, a *K. pneumoniae*. Os padrões de resistência identificados e o que foi analisado sugerem que tais variantes são resultado de uma característica destacada na literatura sobre essa espécie, que é a plasticidade do genoma das cepas. Em estudo de Felgueiras e colaboradores em 2021, confirmam tal característica da espécie ser responsável pelo surgimento de Vf em um paciente, o que também foi observado nos estudos de Cheng e colaboradores (Cheng *et al.*, 2022).

Tal evento pode culminar para a não identificação desses eventos pelo laboratório clínico responsável pelo processamento das amostras, devido ao isolamento de uma única cepa crescida por placa de hemocultura. Semelhantemente ao ocorrido com as cepas isoladas pelo

grupo de Cheng, que não tiveram as cepas Vf isoladas pelo laboratório clínico, devido ao isolamento de uma única cepa índice (Cheng *et al.*, 2022). Em outro estudo elaborado por Bradrane e colaboradores em 2023 com amostras de *Candida* spp., analisaram as Vf em cepas isoladas de ICS em pacientes com comorbidades no trato gastrointestinal ou biliar (Bradrane *et al.*, 2023). Nesse estudo, utilizaram uma cepa “índice”, que é a cepa que foi primeiramente isolada da garrafa de hemocultura positivada, através da análise do morfotipo observado pelo laboratório clínico (Bradrane *et al.*, 2023). Foi observado uma diversidade antimicrobiana e genotípica de cepas isoladas das amostras clínicas, as quais o laboratório clínico não havia identificado ao processar as amostras (Bradrane *et al.*, 2023). Esses estudos mimetizam situação semelhante ao possível ocorrido no presente trabalho, dos perfis de resistência aos antimicrobianos analisados e do laudo, onde alguns não foram identificados pelo laboratório clínico. Isso pode influenciar na escolha do antibiótico para tratar o paciente, pois se uma cepa é resistente ao antimicrobiano de escolha mas considerada sensível pelo laboratório clínico, isso pode culminar em um tratamento ineficaz para o paciente. A partir do estudo de Cheng e colaboradores que observaram os mesmos fenômenos *in vivo*, e que investigaram a ocorrência de Vf em cepas de *K. pneumoniae*, pode-se inferir que eventos de Vf em ICS não apenas são possíveis, mas também são respaldados pela literatura citada sobre a ocorrência desses fenômenos em *K. pneumoniae* (Cheng *et al.*, 2022).

Os pacientes do presente estudo compõem uma população na qual o quadro de mucosite pode estar presente, devido ao tratamento, o que facilitaria a translocação bacteriana do trato gastrointestinal para outros sítios corporais. Os dois pacientes que tiveram mais de um episódio de ICS (P20 e P34) apresentaram o maior número de cepas com diferentes perfis de resistência aos antimicrobianos. Isso levanta a questão se a recorrência das ICS proporcionou mais oportunidades de identificação de Vf ou se o quadro infeccioso prolongado é um fator contribuinte para o surgimento de Vf. O estudo de Cheng e colaboradores em 2022 relata que a ocorrência da Vf já foi explorada em outros estudos em sítios não estéreis, sendo o principal o trato gastrointestinal (Cheng *et al.*, 2022). Um achado ainda mais impressionante é a ocorrência desses eventos em sítios estéreis, como a corrente sanguínea, já que no trato gastrointestinal é mais compreensível supor que tais eventos ocorram devido à presença da microbiota local. Supõe-se que possivelmente houve uma pressão seletiva que promoveu a diversidade em outro sítio, provavelmente no trato gastrointestinal desses pacientes, dado que é corroborado que os patógenos causadores de ICS frequentemente têm origem nesse local (Cheng *et al.*, 2022). Outra teoria levantada é que a diversidade de Vf pode ter ocorrido devido

aos episódios recorrentes de ICS, resultantes da longa interação entre patógeno e hospedeiro (Didelot *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2022), em um estudo sobre a evolução de patógenos dentro do hospedeiro, elaboraram outras teorias, sugerindo que a geração de diversidade genética é uma consequência da evolução da cepa em coexistência com o microbioma. A ocorrência de Vf pode ser atribuída a diversos fatores, incluindo a interação de longo prazo entre hospedeiro e microorganismo (Didelot *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2022). No entanto, os estudos de Didelot e colaboradores destacam que os impactos dessas interações no desfecho clínico precisam ser mais bem elucidados. Cheng e colaboradores em 2022 sugeriram que o fenômeno das Vf deve ser mais explorado e, se confirmado como um determinante no curso clínico da doença, as metodologias clínicas de isolamento e identificação devem ser ajustadas.

O presente estudo apresentou algumas limitações, como o não isolamento de mais de uma colônia crescida por placa recebida; a falta da pesquisa de genes codificadores de CTX-M de outros grupos em cepas que tiveram resultado fenotípico inconclusivo e não foram positivas para *bla*_{CTX-M-1/2}; a pesquisa de outros genes codificadores de carbapenemase relacionados às cepas negativas para *bla*_{KPC}, mas que apresentaram resistência aos carbapenêmicos.

Apesar dessas limitações, foi possível analisar que houve a diversidade de espécies e subespécies de cepas de *Klebsiella* spp. coexistindo simultaneamente em episódios de ICS, e mais relevante ainda a existência de subpopulações de *K. pneumoniae* com perfis de resistência aos antimicrobianos e presença de elementos genéticos diferentes dessa resistência. A presença dessas variantes não costuma ser identificada pelos laboratórios clínicos, uma vez que os métodos de identificação padronizados não incluem testes genotípicos para diferenciação de cepas Vf, somente para identificação de genes de resistência aos antimicrobianos de relevância clínica. Não há especificação expressa, desses detalhes minuciosos que são cruciais, nos manuais da Anvisa. Isso leva à não identificação deste fenômeno, além de poder resultar em um tratamento não ideal para os pacientes imunocomprometidos do presente estudo. Estudos voltados para a compreensão da magnitude com a qual variantes fenotípicas acontecem em diferentes infecções, por diferentes microrganismos e em diferentes populações, e que avaliem a relação deste fenômeno com o desfecho clínico, são absolutamente necessários para que se avalie a necessidade de alterar os protocolos padrão para diagnóstico microbiológico das infecções.

7 CONCLUSÃO

- Espécies diferentes do KpSC podem coexistir em um mesmo episódio de ICS.
- A recuperação de variantes fenotípicas em um mesmo episódio de ICS sugere que a homogeneidade do aspecto colonial não reflete necessariamente uma população microbiana com perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos igualmente homogêneo.
- A ocorrência de Vf em *K. pneumoniae* foi mais frequente do que nas demais espécies causadoras de ICS na coorte.
- Os métodos de identificação clínicos atuais não são amplos o suficiente para o isolamento e identificação de Vf e de espécies do KpSC.

8 REFERÊNCIAS

- Ahmed, S., Ahmed, M. Z., Rafique, S., Almasoudi, S. E., Shah, M., Jalil, N. A. C., & Ojha, S. C. (2023). Recent Approaches for Downplaying Antibiotic Resistance: Molecular Mechanisms. *BioMed Research International*, 2023(1), 5250040. <https://doi.org/10.1155/2023/5250040>
- Almeida, V. L., Leitão, A., Reina, L. d C. B., Montanari, C. A., Donnici, C. L., & Lopez, M. T. P. (2005, fevereiro). *SciELO - Brasil—Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução*. <https://www.scielo.br/j/qn/a/9wKB9z7fFmnVTZtGYbzhj5F/>
- Anvisa. (2022). *Manuais de microbiologia clínica*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/manuais/manuais-de-microbiologia-clinica>
- Arruda, C. J. M. de, Siqueira, V. F. de A., Souza, F. J. M. de, Silva, J. L. das N., Santos, K. F. dos, Cipriano, D. Z., Dias, L. A. de S., & Faro, F. R. A. (2019). *REVISÃO BIBLIOGRAFICA DE ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS*. Revista Saúde em Foco. https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2019/10/085_Revis%C3%A3o-bibliogr%C3%A1fica-de-antibi%C3%B3ticos-beta-lact%C3%A2micos-982-a-995.pdf
- Adhikari, shreya D., Chaudhuri, S., Boodman, C., Gupta, M., Schito, M., Stone, H., & Gupta, N. (2023). Fosfomycin for Non-Urinary Tract Infections: A systematic review. *Le Infezioni in Medicina*, 31(2), 163–173. <https://doi.org/10.53854/liim-3102-4>
- Badrane, H., Cheng, S., Dupont, C. L., Hao, B., Driscoll, E., Morder, K., Liu, G., Newbrough, A., Fleres, G., Kaul, D., Espinoza, J. L., Clancy, C. J., & Nguyen, M. H. (2023). Genotypic diversity and unrecognized antifungal resistance among populations of *Candida glabrata* from positive blood cultures. *Nature Communications*, 14(1), 5918. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41509-x>
- Bharathwaj, M., Webb, C. T., Vadlamani, G., Stubenrauch, C. J., Palmer, T., & Lithgow, T. (2021). The Carbapenemase BKC-1 from *Klebsiella pneumoniae* Is Adapted for Translocation by Both the Tat and Sec Translocons. *mBio*, 12(3), e0130221. <https://doi.org/10.1128/mBio.01302-21>
- Bomfim, I. F. N. M., Almeida Amaral, M., Corrêa Rodrigues, Y., Murici Brasiliense, D., Martins Aires, C. A., & Neto, R. M. (2023). High-risk clones of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* colonizing ICU patients in Natal, northeastern Brazil. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, 13(3). <https://doi.org/10.17058/reci.v13i3.18307>
- Borghini, M., Pereira, M. F., & Schuenck, R. P. (2023). The Presence of Virulent and Multidrug-Resistant Clones of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Southeastern Brazil. *Current Microbiology*, 80(9), 286. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03403-z>
- Botelho, L. A. B. (2016). *Elementos genéticos móveis associados à presença e disseminação de β-lactamases em bactérias do gênero Escherichia isoladas de carne de frango*. / UFRJ,.
- Botelho, L. A. B., Kraychete, G. B., Rocha, P. B., da-Silva, A. P. de S., Picão, R. C., Moreira, B. M., & Bonelli, R. R. (2020). CTX-M- and pAmpC-Encoding Genes Are Associated with Similar Mobile Genetic Elements in *Escherichia coli* Isolated from Different Brands of Brazilian Chicken Meat. *Microbial Drug Resistance*, 26(1), 14–20. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0043>

- BrCAST. (2024). *BrCAST – Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing—Tabelas de pontos de corte, instruções e outros documentos*. <https://brcast.org.br/documentos/documentos-3/>
- Breurec, S., Melot, B., Hoen, B., Passet, V., Schepers, K., Bastian, S., & Brisse, S. (2016). Liver Abscess Caused by Infection with Community-Acquired *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*. *Emerging Infectious Diseases*, 22(3), 529–531. <https://doi.org/10.3201/eid2203.151466>
- Bridel, S., Watts, S. C., Judd, L. M., Harshegyi, T., Passet, V., Rodrigues, C., Holt, K. E., & Brisse, S. (2021). *Klebsiella* MALDI TypeR: A web-based tool for *Klebsiella* identification based on MALDI-TOF mass spectrometry. *Research in Microbiology*, 172(4), 103835. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103835>
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2014). *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg—26.ed.* AMGH Editora.
- Bush, K. (2018). *Past and Present Perspectives on β -Lactamases / Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aac.01076-18>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8), a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2), 10.1128/cmr.00047-19. <https://doi.org/10.1128/cmr.00047-19>
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6), 1211–1233.
- Camargo, C. H., Yamada, A. Y., de Souza, A. R., Cunha, M. P. V., Ferraro, P. S. P., Sacchi, C. T., dos Santos, M. B., Campos, K. R., Tiba-Casas, M. R., Freire, M. P., & Barretti, P. (2023). Genomic analysis and antimicrobial activity of β -lactam/ β -lactamase inhibitors and other agents against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Brazilian hospitals. *Scientific Reports*, 13(1), 14603. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41903-x>
- Campana, E. H., Barbosa, P. P., Fehlberg, L. C. C., & Gales, A. C. (2013). Frequency of plasmid-mediated AmpC in Enterobacteriaceae isolated in a Brazilian Teaching Hospital. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 477–480. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200023>
- Carvalho, I., Chenouf, N. S., Carvalho, J. A., Castro, A. P., Silva, V., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Enes Dapkevicius, M. de L. N., Igrejas, G., Torres, C., & Poeta, P. (2021). Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring extended spectrum β -lactamase encoding genes isolated from human septicemias. *PLoS ONE*, 16(5), e0250525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250525>
- Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum β -lactamases: An update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 3(3), dlab092. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>
- Chen, S., Lin, K., Li, Q., Luo, X., Xiao, M., Chen, M., Zhu, H., Chen, Y., Wu, X., Zeng, Y., Zhang, Y., Ally, I. H., Xu, J., Ren, J., Chen, Z., Hu, J., & Yang, T. (2021a). A practical update on the epidemiology and risk factors for the emergence and mortality of bloodstream infections from real-world data of 3014 hematological malignancy patients receiving chemotherapy. *Journal of Cancer*, 12(18), 5494–5505. <https://doi.org/10.7150/jca.50802>

Chen, S., Lin, K., Li, Q., Luo, X., Xiao, M., Chen, M., Zhu, H., Chen, Y., Wu, X., Zeng, Y., Zhang, Y., Ally, I. H., Xu, J., Ren, J., Chen, Z., Hu, J., & Yang, T. (2021b). A practical update on the epidemiology and risk factors for the emergence and mortality of bloodstream infections from real-world data of 3014 hematological malignancy patients receiving chemotherapy. *Journal of Cancer*, *12*(18), 5494–5505. <https://doi.org/10.7150/jca.50802>

Chen, Y., Brook, T. C., Soe, C. Z., O'Neill, I., Alcon-Giner, C., Leelastwattanagul, O., Phillips, S., Caim, S., Clarke, P., Hall, L. J., & Hoyles, L. (2020). Preterm infants harbour diverse *Klebsiella* populations, including atypical species that encode and produce an array of antimicrobial resistance- and virulence-associated factors. *Microbial Genomics*, *6*(6), e000377. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000377>

Cheng, S., Fleres, G., Chen, L., Liu, G., Hao, B., Newbrough, A., Driscoll, E., Shields, R. K., Squires, K. M., Chu, T., Kreiswirth, B. N., Nguyen, M. H., & Clancy, C. J. . (2022). Within-Host Genotypic and Phenotypic Diversity of Contemporaneous Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* from Blood Cultures of Patients with Bacteremia. <https://doi.org/10.1128/mbio.02906-22>

Choi, H., Ahn, H., Lee, R., Cho, S.-Y., & Lee, D.-G. (2022). Bloodstream Infections in Patients with Hematologic Diseases: Causative Organisms and Factors Associated with Resistance. *Infection & Chemotherapy*, *54*(2), 340–352. <https://doi.org/10.3947/ic.2022.0069>

Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, *303*(6), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>

Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., & Blair, J. M. A. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*, *21*(5), 280–295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>

Deglmann, R. C., Kobs, V. C., Oliveira, D. de, Burgardt, P., França, P. H. C. de, & Pilonetto, M. (2019). Earliest identification of New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1) in *Acinetobacter pittii* in Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *52*, e20180348. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0348-2018>

Dell'Annunziata, F., Folliero, V., Giugliano, R., De Filippis, A., Santarcangelo, C., Izzo, V., Daglia, M., Galdiero, M., Arciola, C. R., & Franci, G. (2021). Gene Transfer Potential of Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(11), 5985. <https://doi.org/10.3390/ijms22115985>

Dias, R. C. da S., Borges-Neto, A. A., D'Almeida Ferraiuoli, G. I., de-Oliveira, M. P., Riley, L. W., & Moreira, B. M. (2008). Prevalence of AmpC and other β -lactamases in enterobacteria at a large urban university hospital in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *60*(1), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.018>

Didelot, X., Walker, A. S., Peto, T. E., Crook, D. W., & Wilson, D. J. (2016). Within-host evolution of bacterial pathogens. *Nature reviews. Microbiology*, *14*(3), 150–162. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.13>

Dinkelacker, A. G., Vogt, S., Oberhettinger, P., Mauder, N., Rau, J., Kostrzewa, M., Rossen, J. W. A., Autenrieth, I. B., Peter, S., & Liese, J. (2018). Typing and Species Identification of Clinical *Klebsiella* Isolates by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(11), 10.1128/jcm.00843-18. <https://doi.org/10.1128/jcm.00843-18>

- Dong, N., Yang, X., Chan, E. W.-C., Zhang, R., & Chen, S. (2022). *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *EBioMedicine*, 79, 103998. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103998>
- Forbes, B. A., Sahm, D. F., Weissfeld, A. S., & Bailey, W. R. (2007). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology* (12th ed). Elsevier Mosby.
- Fostervold, A., Raffelsberger, N., Hetland, M. A. K., Bakksjø, R., Bernhoff, E., Samuelsen, Ø., Sundsfjord, A., Afset, J. E., Berntsen, C. F., Bævre-Jensen, R., Ebbesen, M. H., Gammelsrud, K. W., Guleng, A. D., Handal, N., Jakovljevic, A., Johal, S. K., Marvik, Å., Natvik, A., Sandnes, R.-A., ... Löhr, I. H. (2024). Risk of death in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections is associated with specific phylogenetic lineages. *Journal of Infection*, 88(5), 106155. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2024.106155>
- Gaetano, G. V. D., Lentini, G., Famà, A., Coppolino, F., & Beninati, C. (2023). Antimicrobial Resistance: Two-Component Regulatory Systems and Multidrug Efflux Pumps. *Antibiotics*, 12(6), Artigo 6. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12060965>
- Gajic, I., Kabic, J., Kekic, D., Jovicevic, M., Milenkovic, M., Mitic Culafic, D., Trudic, A., Ranin, L., & Opavski, N. (2022). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiotics*, 11(4), Artigo 4. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040427>
- Garza-Ramos, U., Moreno-Dominguez, S., Hernández-Castro, R., Silva-Sanchez, J., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Sanchez-Perez, A., Carrillo-Casas, E. M., Sanchez-León, M. C., & Moncada-Barron, D. (2016). Identification and Characterization of Imipenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and Susceptible *Klebsiella variicola* Isolates Obtained from the Same Patient. *Microbial Drug Resistance*, 22(3), 179–184. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0181>
- Goering, R. V., Dockrell, H. M., Zuckerman, M., & Chiodini, P. L. (2020). *Mims Microbiologia Médica e Imunologia*. GEN Guanabara Koogan.
- Gogoi, I., Saikia, S., Sharma, M., Onyango, A. O., Puzari, M., & Chetia, P. (2023). Prevalence and distribution pattern of AmpC β -lactamases in ESBL producing clinical isolates of *Klebsiella* spp. In parts of Assam, India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(1), 38. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03846-3>
- Guo, Q., Tomich, A. D., McElheny, C. L., Cooper, V. S., Stoesser, N., Wang, M., Sluis-Cremer, N., & Doi, Y. (2016). Glutathione-S-transferase FoaA6 of *Klebsiella pneumoniae* origin conferring fosfomycin resistance in ESBL-producing *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(9), 2460–2465. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw177>
- Hossain, A., Ferraro, M. J., Pino, R. M., Dew, R. B., Moland, E. S., Lockhart, T. J., Thomson, K. S., Goering, R. V., & Hanson, N. D. (2004). Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(11), 4438–4440. <https://doi.org/10.1128/aac.48.11.4438-4440.2004>
- Karampatakis, T., Tsergouli, K., & Behzadi, P. (2023). Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Factors, Molecular Epidemiology and Latest Updates in Treatment Options. *Antibiotics*, 12(2), Artigo 2. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020234>
- Kazmierczak, K. M., Biedenbach, D. J., Hackel, M., Rabine, S., de Jonge, B. L. M., Bouchillon, S. K., Sahm, D. F., & Bradford, P. A. (2016). Global Dissemination of *bla*KPC into Bacterial Species beyond *Klebsiella pneumoniae* and In Vitro Susceptibility to Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam-Avibactam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(8), 4490–4500. <https://doi.org/10.1128/aac.00107-16>

Keohane, E. M., Otto, C. N., & Walenga, J. M. (2019). *Rodak's Hematology - E-Book: Rodak's Hematology - E-Book*. Elsevier Health Sciences.

Kim, C. H. (2010). Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *Journal of blood medicine, 1*, 13–19.

Kieffer, N., & Guzmán-Puche, J. (2024). The Importance of Genomic Context in Interpreting Fosfomycin Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents, 64*(2), 107210. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2024.107210>

Koga, V. L., Maluta, R. P., da Silveira, W. D., Ribeiro, R. A., Hungria, M., Vespero, E. C., Nakazato, G., & Kobayashi, R. K. T. (2019). Characterization of CMY-2-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses and human infection in a city of South Brazil. *BMC Microbiology, 19*(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1550-3>

Lalaoui, R., Javelle, E., Bakour, S., Ubeda, C., & Rolain, J.-M. (2020). Infections Due to Carbapenem-Resistant Bacteria in Patients With Hematologic Malignancies. *Frontiers in Microbiology, 11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01422>

Lee, C.-R., Lee, J. H., Park, K. S., Kim, Y. B., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2016). Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Frontiers in Microbiology, 7*, 895. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00895>

Li, J., Long, D., Wang, Y., Wang, J., Mu, S., Chen, L., & Shi, X. (2021). Fatal sepsis caused by mixed bloodstream infection of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola* in community: A case report in China. *MOJ Clinical & Medical Case Reports, 11*(2), 24–29. <https://doi.org/10.15406/mojcr.2021.11.00375>

Maatallah, M., Vading, M., Kabir, M. H., Bakhrouf, A., Kalin, M., Naucler, P., Brisse, S., & Giske, C. G. (2014). *Klebsiella variicola* Is a Frequent Cause of Bloodstream Infection in the Stockholm Area, and Associated with Higher Mortality Compared to *K. pneumoniae*. *PLOS ONE, 9*(11), e113539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113539>

Machado, M., Correia, A., Menezes Falcão, L., & Ravara, L. (2004). *Linfoma de Hodgkin—Conceitos actuais Hodgkin's lymphoma—An update*.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2016). *Microbiologia de Brock—14ª Edição*. Artmed Editora.

Mahon, C. R., & Lehman, D. C. (2019). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Elsevier. <http://repository.stikesrspadgs.ac.id/42/>

Majumdar, A., Shah, M. R., Park, J. J., Narayanan, N., Kaye, K. S., & Bhatt, P. J. (2023). Challenges and Opportunities in Antimicrobial Stewardship among Hematopoietic Stem Cell Transplant and Oncology Patients. *Antibiotics, 12*(3), Artigo 3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030592>

Martin, M. J., Stribling, W., Ong, A. C., Maybank, R., Kwak, Y. I., Rosado-Mendez, J. A., Preston, L. N., Lane, K. F., Julius, M., Jones, A. R., Hinkle, M., Waterman, P. E., Lesho, E. P., Lebreton, F., Bennett, J. W., & Mc

Gann, P. T. (2023). A panel of diverse *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates for research and development. *Microbial Genomics*, 9(5), 000967. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000967>

Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>

Medina, N. R., Barrios-Camacho, H., Duran-Bedolla, J., & Garza-Ramos, U. (2019). *Klebsiella variicola*: An emerging pathogen in humans. *Emerging Microbes & Infections*, 8(1), 973–988. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1634981>

Medina, N. R., Rodríguez-Santiago, J., Alvarado-Delgado, A., Sagal-Prado, A., Silva-Sánchez, J., De la Cruz, M. A., Ares, M. A., Sánchez-Arias, M., Morfín-Otero, R., Hernández-Castro, R., Cornejo-Juárez, P., Jiménez-Villanueva, E., Sánchez-Francia, D., & Garza-Ramos, U. (2024). Comprehensive study reveals phenotypic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* species complex isolates. *Scientific Reports*, 14, 5876. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55546-z>

Melo, L. C., Oresco, C., Leigue, L., Netto, H. M., Melville, P. A., Benites, N. R., Saras, E., Haenni, M., Lincopan, N., & Madec, J.-Y. (2018). Prevalence and molecular features of ESBL/pAmpC-producing Enterobacteriaceae in healthy and diseased companion animals in Brazil. <https://bv.fapesp.br/pt/publicacao/149888/prevalence-and-molecular-features-of-esblpampc-producing-en>

Mendes, R. E., Kiyota, K. A., Monteiro, J., Castanheira, M., Andrade, S. S., Gales, A. C., Pignatari, A. C. C., & Tufik, S. (2007). Rapid Detection and Identification of Metallo- β -Lactamase-Encoding Genes by Multiplex Real-Time PCR Assay and Melt Curve Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 544–547. <https://doi.org/10.1128/jcm.01728-06>

Noster, J., Thelen, P., & Hamprecht, A. (2021). Detection of Multidrug-Resistant Enterobacterales—From ESBLs to Carbapenemases. *Antibiotics*, 10, 1140. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091140>

Noval, M., Banoub, M., Claeys, K. C., & Heil, E. (2020). The Battle Is on: New Beta-Lactams for the Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Organisms. *Current Infectious Disease Reports*, 22(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s11908-020-0710-9>

Oliveira, L. S., Cruz, J. A. L. da, Rockenbach, M., & Dobrachinski, L. (2021). Aspectos clínicos e histopatológicos dos linfomas Hodking e não Hodking: Uma revisão sistemática / Clinical and histopathological aspects of Hodking and non-Hodking lymphomas: a systematic review. *Brazilian Journal of Development*, 7(2), 15808–15815. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-280>

Paczosa, M. K., & Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 80(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>

Paes, R. A. P., Vassallo, J., Alves, A. C., Menezes, Y., Siqueira, S. A. C., Aldred, V. L., Soares, F., & Moraes, J. C. (2002). Classificação da Organização Mundial de Saúde para as neoplasias dos tecidos hematopoiético e linfóide: Proposta de padronização terminológica em língua portuguesa do grupo de hematopatologia da Sociedade Brasileira de Patologia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 38, 237–239. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442002000300013>

Palzkill, T. (2018). Structural and Mechanistic Basis for Extended-Spectrum Drug-Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM, CTX-M, and KPC β -lactamases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5, 16. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00016>

- Parslow, T. G., Stites, D. P., Terr, A. I., & Imboden, J. B. (2004). *IMUNOLOGIA MÉDICA*. Editora Guanabara Koogan.
- Pitout, J. D. D., Nordmann, P., & Poirel, L. (2015). Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(10), 5873–5884. <https://doi.org/10.1128/AAC.01019-15>
- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, *11*(4), 589–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.589>
- Poirel, L., Benouda, A., Hays, C., & Nordmann, P. (2011). Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *66*(12), 2781–2783. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr384>
- Ramos, P. I. P., Picão, R. C., Almeida, L. G. P. de, Lima, N. C. B., Girardello, R., Vivan, A. C. P., Xavier, D. E., Barcellos, F. G., Pelisson, M., Vespero, E. C., Médigue, C., Vasconcelos, A. T. R. de, Gales, A. C., & Nicolás, M. F. (2014). Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. *BMC Genomics*, *15*, 54. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-54>
- Raro, O. H. F., da Silva, R. M. C., Filho, E. M. R., Sukiennik, T. C. T., Stadnik, C., Dias, C. A. G., Oteo Iglesias, J., & Pérez-Vázquez, M. (2020). Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* From Transplanted Patients in Brazil: Phylogeny, Resistome, Virulome and Mobile Genetic Elements Harboring blaKPC-2 or blaNDM-1. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01563>
- Rieger, M. A., & Schroeder, T. (2012). Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(12), a008250. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008250>
- Rodrigues, C., Passet, V., & Brisse, S. (2018). Identification of *Klebsiella pneumoniae* complex members using MALDI-TOF mass spectrometry. <https://doi.org/10.1101/350579>
- Sader, H. S., Mendes, R. E., Carvalhaes, C. G., Kimbrough, J. H., & Castanheira, M. (2023). Changing Epidemiology of Carbapenemases Among Carbapenem-Resistant Enterobacterales From United States Hospitals and the Activity of Aztreonam-Avibactam Against Contemporary Enterobacterales (2019–2021). *Open Forum Infectious Diseases*, *10*(2), ofad046. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofad046>
- Safdar, A., & Armstrong, D. (2011). Infections in Patients With Hematologic Neoplasms and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Neutropenia, Humoral, and Splenic Defects. *Clinical Infectious Diseases*, *53*(8), 798–806. <https://doi.org/10.1093/cid/cir492>
- Sagar, S., Kaistha, S., Das, A. J., & Kumar, R. (2019). Extrinsic Antibiotic-Resistant Mechanism in Bacteria. Em S. Sagar, S. Kaistha, A. J. Das, & R. Kumar (Orgs.), *Antibiotic Resistant Bacteria: A Challenge to Modern Medicine* (p. 87–103). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9879-7_7
- Saxenborn, P., Baxter, J., Tilevik, A., Fagerlind, M., Dyrkell, F., Pernestig, A.-K., Enroth, H., & Tilevik, D. (2021). Genotypic Characterization of Clinical *Klebsiella* spp. Isolates Collected From Patients With Suspected Community-Onset Sepsis, Sweden. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.640408>

Sękowska, A. (2024). In Vitro Activity of “Old” and “New” Antimicrobials against the *Klebsiella pneumoniae* Complex. *Antibiotics*, *13*(2), Artigo 2. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13020126>

Silver, L. L. (2017). Fosfomycin: Mechanism and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(2), a025262. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025262>

Shi, L., Lei, T., Huo, Y., Chen, Y., Wang, C., & Wang, S. (2024). A Review of the Application of mNGS in Hematologic Malignancy. *Intensive Care Research*, *4*(1), 9–18. <https://doi.org/10.1007/s44231-023-00053-4>

Timsit, J.-F., Soubirou, J.-F., Voiriot, G., Chemam, S., Neuville, M., Mourvillier, B., Sonnevile, R., Mariotte, E., Bouadma, L., & Wolff, M. (2014). Treatment of bloodstream infections in ICUs. *BMC Infectious Diseases*, *14*, 489. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-489>

Tsai, Y.-K., Fung, C.-P., Lin, J.-C., Chen, J.-H., Chang, F.-Y., Chen, T.-L., & Siu, L. K. (2011). *Klebsiella pneumoniae* Outer Membrane Porins OmpK35 and OmpK36 Play Roles in both Antimicrobial Resistance and Virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(4), 1485–1493. <https://doi.org/10.1128/AAC.01275-10>

Tumbarello, M., Sanguinetti, M., Montuori, E., Trecarichi, E. M., Posteraro, B., Fiori, B., Citton, R., D’Inzeo, T., Fadda, G., Cauda, R., & Spanu, T. (2007). Predictors of Mortality in Patients with Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*: Importance of Inadequate Initial Antimicrobial Treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*(6), 1987–1994. <https://doi.org/10.1128/aac.01509-06>

Voellmy, I. K., Lang, C., Gasser, M., Kronenberg, A., & on behalf of the Swiss Centre for Antibiotic Resistance (ANRESIS). (2022). Antibiotic resistance surveillance of *Klebsiella pneumoniae* complex is affected by refined MALDI-TOF identification, Swiss data, 2017 to 2022. *Eurosurveillance*, *27*(45). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.45.2200104>

Waszczuk-Gajda, A., Drozd-Sokołowska, J., Basak, G. W., Piekarska, A., Mensah-Glanowska, P., Sadowska-Klasa, A., Wierzbowska, A., Rzepecki, P., Tomaszewska, A., Mańko, J., Hus, M., Adamska, M., Romejko-Jarosińska, J., Dybko, J., Biernat, M., Kyrzcz-Krzemień, S., Sędzimirska, M., Winciorek, N., Jędrzejczak, W. W., ... Gil, L. (2020). Infectious Complications in Patients With Multiple Myeloma After High-Dose Chemotherapy Followed by Autologous Stem Cell Transplant: Nationwide Study of the Infectious Complications Study Group of the Polish Adult Leukemia Group. *Transplantation Proceedings*, *52*(7), 2178–2185. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2020.02.068>

Weniger, M. A., & Küppers, R. (2021). Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Leukemia*, *35*(4), 968–981. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01204-6>

Wisplinghoff, H., Seifert, H., Wenzel, R. P., & Edmond, M. B. (2003). Current Trends in the Epidemiology of Nosocomial Bloodstream Infections in Patients with Hematological Malignancies and Solid Neoplasms in Hospitals in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, *36*(9), 1103–1110. <https://doi.org/10.1086/374339>

Wyres, K. L., Lam, M. M. C., & Holt, K. E. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(6), 344–359. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>

Yang, X., Man, M.-Y., Heng, H., Chan, B. K.-W., Hu, Q., Chan, E. W.-C., Shum, H.-P., & Chen, S. (2024). Molecular epidemiology and clinical impact of *Klebsiella* spp. Causing bloodstream infections in Hong Kong. *eBioMedicine*, *101*. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.104998>

- Yang, X., Wai-Chi Chan, E., Zhang, R., & Chen, S. (2019). A conjugative plasmid that augments virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Microbiology*, *4*(12), 2039–2043. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0566-7>
- Yin, X., Hu, X., Tong, H., & You, L. (2023). Trends in mortality from infection among patients with hematologic malignancies: Differences according to hematologic malignancy subtype. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, *14*, 20406223231173891. <https://doi.org/10.1177/20406223231173891>
- Yu, K., Huang, Z., Xiao, Y., Gao, H., Bai, X., & Wang, D. (2024). Global spread characteristics of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases: A genomic epidemiology analysis. *Drug Resistance Updates*, *73*, 101036. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2023.101036>
- Zhang, P., Wang, J., Hu, H., Zhang, S., Wei, J., Yang, Q., & Qu, T. (2020). Clinical Characteristics and Risk Factors for Bloodstream Infection Due to Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Patients with Hematologic Malignancies. *Infection and Drug Resistance*, *13*, 3233–3242. <https://doi.org/10.2147/IDR.S272217>