

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Faculdade de Ciências Médicas

Thamirys Rachel Tavares e Oliveira

Avaliação da diversidade clonal de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC provenientes de espécimes clínicos através das técnicas de PFGE, MLST e MALDI-TOF

Rio de Janeiro 2024 Thamirys Rachel Tavares e Oliveira

Avaliação da diversidade clonal de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC provenientes de espécimes clínicos através das técnicas de PFGE, MLST e MALDI-TOF

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof.ª Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

O48 Oliveira, Thamirys Rachel Tavares e. Avaliação da diversidade clonal de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC provenientes de espécimes clínicos, através das técnicas de PFGE, MLST e MALDI-TOF / Thamirys Rachel Tavares e Oliveira. – 2024. 78 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Klebsiella pneumoniae* – Genética – Teses. 2. Células clonais – Microbiologia. 3. Variação genética. I. Assef Ana Paula D'Alincourt Carvalho. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU: 579.84:575

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Thamirys Rachel Tavares e Oliveira

Avaliação da diversidade clonal de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC provenientes de espécimes clínicos através das técnicas de PFGE, MLST e MALDI-TOF

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 01 de fevereiro de 2024.

Orientadora:

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Mara Lucia Penna Queiroz Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Orlando Carlos da Conceição Neto Laboratório do Hospital Central da Aeronáutica

Prof. Dr. Bruno Rocha Pribul Fundação Oswaldo Cruz

> Rio de Janeiro 2024

AGRADECIMENTOS

A ciência é colaborativa, eu não posso deixar de expressar minha profunda gratidão a todos aqueles que desempenharam um papel fundamental nessa jornada de mestrado. Estes anos foram de dedicação, aprendizado e superação, e é com imensa alegria que dedico meus agradecimentos a cada um de vocês.

Primeiramente, agradeço a Deus por esta oportunidade única, por me conceder conforto nos momentos difíceis e sabedoria para enfrentar os desafios que surgiram ao longo do caminho.

Às mulheres guerreiras da minha vida, começando pela minha mãe, Tati, minha maior motivadora, obrigada por todas as mensagens e todo acolhimento durante a minha vida, tenho um orgulho imenso de ser sua filha. À minha tia Lili, que me alfabetizou, primeira professora, e à minha avó, que, mesmo com pouca orientação, sempre me incentivou a estudar.

À minha família, meu avô Mauro, meu irmão Gute, meus primos Maria, Matheus, Manu e Tio Zaqueu, agradeço por todo apoio e carinho dedicados ao longo desses anos.

À minha orientadora, Dra Ana Paula Assef pela disponibilidade, apoio e estímulo para que este trabalho se realizasse. Sua orientação foi fundamental para o meu crescimento acadêmico.

Agradeço também às minhas amigas Leilane e Bianca, pelo apoio emocional e pelas trocas de experiência no laboratório. Aprendi muito com vocês. Vocês tornaram a caminhada muito mais leve.

Às minhas companheiras da rotina do LabSUR: Stefany, Camila e Natacha, agradeço a paciência, o suporte no dia a dia e pelos cafés da tarde mais animados.

A todos os colegas do novo LabSUR e do antigo LAPIH: Cláudio, Bruno, Daiana, Mel, Orlando, Thiago, Vanessa, Caio, Joanderson, dentre muitas outras pessoas que fazem parte da equipe e as que já passaram nesta grande família, com quem aprendi a cada dia. Suas contribuições foram valiosas para o meu desenvolvimento acadêmico.

Aos funcionários da plataforma do MALDI-TOF do Instituto Nacional de Infectologia – INI/FIOCRUZ, em especial ao Guilherme e ao Luã, por serem sempre muito atenciosos, agradeço também a disponibilidade para os esclarecimentos de dúvidas e para realização dos experimentos. Aos funcionários do DATT no Rocha Lima (IOC-FIOCRUZ), Davi, Cris, Sr. Jorge, minha gratidão pela confecção dos meios de cultura, pelas conversas e pelos cafés, tornando meus experimentos mais leves.

Aos funcionários da plataforma de Genômica da Rede de Plataformas Tecnológicas do IOC/FIOCRUZ, pelo apoio recebido na confecção dos sequenciamentos deste estudo.

Aos professores, alunos e a secretária Carlinha da Pós-graduação de Microbiologia da UERJ, que tornaram o ambiente acadêmico mais acolhedor.

Á Professora Tatiana Pinto da UFRJ e à doutoranda Ingrid Macedo da PPG Microbiologia da UERJ, pela ajuda na obtenção dos dados no programa *Bionumerics*, meus sinceros agradecimentos.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu percurso no mestrado, meu mais profundo obrigado. Essa conquista não seria possível sem o apoio, compreensão e incentivo de cada um de vocês. Estou verdadeiramente grata.

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."

Louis Pasteur

RESUMO

OLIVEIRA, Thamirys Rachel Tavares e. Avaliação da diversidade clonal de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC provenientes de espécimes clínicos, através das técnicas de PFGE, MLST e MALDI-TOF. 2024. 78 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Espécies de K. pneumoniae produtoras de carbapenemases têm sido rotineiramente isoladas em ambientes hospitalares, especialmente causando infecções graves, nas quais os isolados MDR e XDR são um grave problema de saúde pública. Mundialmente, estudos têm associado clones epidêmicos à disseminação de carbapenemases, evidenciando o CC11/258 como um importante disseminador da carbapenemase KPC. Sendo assim, a tipagem molecular dos clones circulantes que carreiam o gene $bla_{\rm KPC}$ é fundamental para a investigação de surtos hospitalares assim como para a vigilância epidemiológica. O objetivo deste trabalho foi realizar uma avaliação abrangente da diversidade clonal de cepas de K. pneumoniae produtoras de KPC, que foram obtidas de espécimes clínicos e encaminhadas para análise de rotina do Laboratório de Bacteriologia Aplicada à Saúde Única e Resistência antimicrobiana (LabSUR) de diferentes estados brasileiros durante o ano de 2021. Os isolados selecionados para o estudo tiveram sua espécie confirmada por MALDI-TOF e a presença da carbapenemase KPC foi investigada por PCR convencional. As técnicas de tipagem molecular PFGE e MLST foram empregadas a fim de avaliar a relação de clonalidade das cepas recebidas. Além disso, foi explorada a capacidade da ferramenta de Espectrometria de Massas MALDI-TOF em avaliar a diversidade clonal das cepas selecionadas para o estudo. Uma parte crucial deste estudo envolveu a comparação direta dos resultados obtidos pela técnica MALDI-TOF com os grupos clonais obtidos por meio da metodologia de PFGE e MLST.Foram incluídos no estudo, 122 isolados de K. pneumoniae produtores de KPC e a análise da relação de clonalidade através de PFGE nesses isolados revelou 44 grupos clonais, nomeados de PF1 a PF44. Por MLST, foram identificados 16 sequence types diferentes, evidenciando o CC11 como o mais frequente. A tipagem feita utilizando MALDI-TOF gerou 31 clusters, destacando o cluster 19 com maior número de isolados agrupados, onde em grande parte formado pelo PF10 e PF9. Ao realizar a análise dos perfis de agrupamento obtidos por MALDI-TOF e comparar com os grupos clonais obtidos pela metodologia de PFGE e com os STs obtidos pelo MLST, não foi possível estabelecer uma correlação consistente, sendo necessária a realização de pesquisas posteriores que continuem a investigar a viabilidade da aplicação da técnica MALDI-TOF para a tipagem molecular em K. pneumoniae produtoras de KPC, que podem se revelar de grande utilidade em contextos relacionados à avaliação de surtos e monitoramento, permitindo assim medidas de controle.

Palavras-chave: K. pneumoniae. Carbapenemases. KPC. tipagem molecular. MALDI-TOF

ABSTRACT

OLIVEIRA, Thamirys Rachel Tavares e. *Clonal Diversity Evaluation of KPC-Producing Klebsiella pneumoniae from Clinical Specimens Using PFGE, MLST, and MALDI-TOF Techniques.* 2024. 78 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Species of K. pneumoniae producing carbapenemases have been routinely isolated in hospital environments, especially causing severe infections, in which MDR and XDR isolates pose a serious public health problem. Worldwide, studies have associated epidemic clones with the spread of carbapenemases, highlighting CC11/258 as a significant disseminator of KPC carbapenemase. Therefore, molecular typing of circulating clones carrying the $bla_{\rm KPC}$ gene is crucial for investigating hospital outbreaks as well as for epidemiological surveillance. The aim of this study was to perform a comprehensive evaluation of the clonal diversity of KPCproducing K. pneumoniae strains collected from different Brazilian states and sent for routine analysis at the Laboratório de Bacteriologia Aplicada à Saúde Única e Resistência antimicrobiana (LabSUR). The selected isolates for the study had their species confirmed by MALDI-TOF, and the presence of KPC carbapenemase was investigated by conventional PCR. Molecular typing techniques PFGE and MLST were employed to assess the clonality relationship of the received strains. Additionally, the capability of MALDI-TOF Mass Spectrometry tool to evaluate the clonal diversity of the selected strains for the study was explored. A crucial part of this study involved the direct comparison of results obtained by MALDI-TOF technique with the clonal groups obtained through the PFGE methodology.. For the study, were selected 122 KPC-producing K. pneumoniae isolates and the analysis of clonality relationship through PFGE in these isolates revealed 44 clonal groups. By MLST, 16 different sequence types were identified, highlighting CC11 as the most frequent. Typing using MALDI-TOF generated 31 clusters, with cluster 19 standing out with the highest number of grouped isolates, largely composed of PF10 and PF9. When analyzing the clustering profiles obtained by MALDI-TOF and comparing them with the clonal groups obtained by PFGE methodology and the STs obtained by MLST, it was not possible to establish a consistent correlation, necessitating further research to continue investigating the feasibility of applying the MALDI-TOF technique for molecular typing in KPC-producing K. pneumoniae. This could prove to be highly useful in contexts related to outbreak evaluation and monitoring, thus enabling control measure

Keywords: K. pneumoniae. Carbapenemases. KPC. MALDI-TOF

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das β-lactamases segundo Ambler, Bush & Jacoby20
Tabela 2. Significado da pontuação e categorias obtidas através do Módulo flexAnalysis do
MALDI-TOF MS
Tabela 3. Reação para detecção de gene codificador da carbapenemase <i>bla</i> _{KPC} através da PCR
convencional
Tabela 4. Primers para amplificação através de PCR do Protocolo número 2 do Instituto
Pasteur
Tabela 5. Distribuição das 122 amostras de <i>K. pneumoniae</i> de acordo com material clínico44
Tabela 6. Grupos clonais estabelecidos por PFGE das 122 cepas de K. pneumoniae produtoras
de KPC oriundas de nove estados brasileiros
Tabela 7. Distribuição da diversidade genética por meio de MLST para isolados de K.
pneumoniae49
Tabela 8. Distribuição dos clusters obtidos a partir dos espectros de massa gerados através de
MALDI-TOF55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Acetonitrila			
Do inglês α-cyano-4-hydroxycinnamic Acid, traduzido para ácido a-ciano-4-			
hidroxicinâmico			
β-lactamase cromossomal (cefalosporinase)			
Agência Nacional de Vigilância em Saúde			
Bacilo Gram-negativo			
Do inglês Brain Heart Infusion Agar, traduzido para ágar infusão de cére			
coração			
Bruker bacterial test standard			
Do inglês Clonal Complex, traduzido para Complexo Clonal			
Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar			
Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública			
Cefotaxime-Hydrolyzing β -Lactamase			
Ácido Desoxirribonucleico			
Ácido Dipicolínico			
Do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid, traduzido para ácido			
etilenodiamino tetra-acético			
Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos			
Do inglês Extended-spectrum β -lactamase, traduzido para β -lactamase de			
espectro estendido			
European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae			
Fundação Oswaldo Cruz			
Guiana extended-spectrum β -lactamase			
Imipenem-hydrolyzing- β -lactamase			
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas			
Instituto Oswaldo Cruz			
Infecção primária de corrente sanguínea laboratorialmente confirmada			
Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde			
Klebsiella pneumoniae carbapenemase			

LabSUR	Laboratório de Bacteriologia Aplicada à Saúde Única e Resistência antimicrobiana				
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública				
LPS	Lipopolissacarídeo				
MALDI	Ionização por dessorção a laser assistida por matriz				
MALDI-	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry				
TOF MS					
MBL	Metalo-b-lactamase				
MDR	Multidrug-resistant				
MLST	Multilocus Sequence Typing				
MS	Espectrometria de massas				
NDM	Do inglês New Delhi metallo-b-lactamase				
OMS	Organização Mundial de Saúde				
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde				
OXA	Oxacilinase				
PBP	Proteínas de ligação à penicilina				
PCR	Do inglês Polymerase Chain Reaction, traduzido para Reação em Cadeia da				
	Polimerase				
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis				
PME	Proteínas da membrana externa				
RAM	Resistência aos antimicrobianos				
SDS	do inglês Sodium Dodecyl Sulphate, traduzido para dodecilsulfato de Sódio				
ST	Sequence Type				
TBE	Tris Borate EDTA buffer				
TE	Tris-EDTA				
TFA	Do inglês Trifluoroacetic Acid, traduzido para ácido trifluoroacético				
TOF	Time of Flight				
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro				
UF	Unidade da Federação				
UTI	Unidade de Terapia Intensiva				
WGS	do inglês Whole Genome Sequencing, traduzido para sequenciamento do				
	genoma completo				
XDR	Extensively-drug resistant				

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
≥	Maior ou igual a
<	Menor que
>	Maior que
+	Adição ou positivo
-	Negativo
±	Mais ou menos
Kb	Kilobase
Kda	Kilodalton
Mb	Milhões de pares de bases ou Megabases
rpm	Rotação por minuto
m/z	Massa/carga
mL	Mililitro
L	Litro
G	Grama
μL	Microlitro
μg	Micrograma
U	Unidade
μΜ	Micrômetro
V	Volts
Х	Multiplicação
pb	Pares de base
S	Segundo

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	32
1.1	Objetivo Geral	32
1.2	Objetivos Específicos	32
2	MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1	Seleção e preparação das cepas para o estudo	33
2.2	Identificação confiável das cepas através do aparelho de MALDI-TOF	33
2.2.1	Extração direta para identificação das cepas	34
2.2.1.1	Obtenção e análise dos espectros de massa para identificação das cepas	34
2.3	Confirmação da presença do gene <i>bla</i> KPC	35
2.3.1	Extração de ácido desoxirribonucleico (DNA)	35
2.3.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	36
2.3.3	Eletroforese em gel de agarose	36
2.4	Determinação da diversidade genética através de PFGE	37
2.4.1	Aprisionamento das células em blocos de agarose (plug)	37
2.4.2	Digestão enzimática	38
2.4.3	Separação dos fragmentos através de corrida eletroforética	38
2.4.4	Análise dos perfis de fragmentação do DNA para avaliação da diversidade	
	<u>clonal</u>	39
2.5	Determinação da diversidade genética por meio de MLST	39
2.6	Desenvolvimento e análise de perfil de agrupamentos obtidos por	
	espectrometria de massa (MALDI-TOF)	41
2.6.1	Extração total das cepas para perfil de agrupamentos obtidos por espectrometria	
	de massa (MALDI-TOF)	41
2.6.2	Obtenção e análise dos espectros para perfil de agrupamentos obtidos por	
	espectrometria de massa (MALDI-TOF)	42
2.6.3	Construção do dendrograma utilizando MALDI-TOF	42
3	RESULTADOS	43
3.1	Cepas selecionadas para estudo	43
3.2	Determinação da diversidade genética	44

3.2.1	Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico através de PFGE	44
3.2.2	Determinação de Sequence type (ST)	49
3.3	Perfil de agrupamento obtido por espectrometria de massa	52
4	DISCUSSÃO	59
	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS	67

INTRODUÇÃO

Infecções relacionadas à assistência à saúde e a resistência aos antimicrobianos no cenário atual

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) referem-se a qualquer tipo de infecção adquirida após a admissão do paciente na unidade hospitalar, que se apresente durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares, de acordo com a Lei nº. 9.431 de 6 de janeiro de 1997 e a Portaria do Ministério da Saúde nº 2.616 de 1998 (BRASIL, 2004).

De acordo com a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), as IRAS são uma grande ameaça à saúde pública em uma escala global, visto que são frequentemente causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos, o que agrava ainda mais o problema (VÁZQUEZ-CABRERA *et al.*,2023).

A falta de eficácia dos antimicrobianos pode acarretar infecções persistentes no organismo, aumentando o risco da disseminação entre indivíduos, o comprometimento do sucesso de procedimentos cirúrgicos, além de ocasionar o prolongamento do tratamento. Portanto, as IRAS associadas a microrganismos resistentes aos antimicrobianos representam um desafio que impacta diretamente na segurança do paciente e no aumento dos custos dos serviços de saúde, necessitando que ações sejam tomadas em todos os segmentos do governo e da sociedade (VÁZQUEZ-CABRERA *et al.*,2023).

Com base em cenários do aumento alarmante da resistência aos antimicrobianos (RAM), a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que o número de óbitos pode chegar à marca de 10 milhões até o ano de 2050. A menos que medidas efetivas sejam rapidamente colocadas em prática, o aumento da resistência aos antimicrobianos pode gerar um custo cumulativo para a produção econômica global de 100 trilhões de dólares (O'NEILL *et al.*, 2019).

De acordo com estudo de MURRAY e colaboradores, publicado em 2022, os seis principais patógenos associados a óbitos atribuíveis à RAM (*Escherichia coli*, seguido por *Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Streptococcus pneumoniae, Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*) foram responsáveis por aproximadamente 3,57 milhões de mortes no mundo no ano de 2019.

De acordo com a OPAS, o surgimento de patógenos Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos, produtores de carbapenemases, provocam uma grande ameaça a saúde pública. Esses microrganismos podem causar surtos e contribuir para a transmissão generalizada de resistência através de elementos genéticos móveis, gerando uma preocupação internacional (OPAS, 2021).

Em 2017, a OMS publicou uma lista de agentes patogênicos prioritários que demandam esforços significativos em pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos. Na categoria crítica, encontram-se os microrganismos da família Enterobacteriaceae, que apresentem resistência aos carbapenêmicos e/ou produzam enzimas de espectro estendido (ESBL), além de *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos (OMS, 2017; TACCONELLI, *et al.*, 2018).

Klebsiella pneumoniae: características gerais e importância clínica

Em 1882, Carl Friedlander descreveu formalmente um bacilo encapsulado, isolado dos pulmões de pacientes que faleceram de pneumonia, que originalmente ficou conhecido como bacilo de Friedlander (*apud* ASHURST & DAWSON,2023). Você só possui acesso à obra de X, mas precisa citar as ideias de Y em seu trabalho. Você então deve citar o texto como Y apud X.

Posteriormente, no ano de 1886, a bactéria recebeu o nome de *Klebsiella*, em homenagem ao respeitável bacteriologista alemão Theodor Albrecht Edwin Klebs, pioneiro na pesquisa de doenças infecciosas (*apud* ROSENBERG *et al.*, 2006).

O gênero *Klebsiella* pertence à classe Gammaproteobacteria, contida dentro do maior grupo da ordem Enterobacterales, um grupo grande e diversificado que habita vários nichos ecológicos e já foram encontrados no solo, na água e em associação com organismos vivos, incluindo plantas, insetos, animais e humanos (ADEOLU *et al.*, 2016). Pertence à família Enterobacteriaceae e apresenta-se como bacilo Gram-negativo (BGN), usualmente encapsulado, imóvel, anaeróbio facultativo, não formador de esporos. Seu tamanho pode variar de 0,3 a 1,0 µm de diâmetro e 0,6 a 6,0 µm de comprimento e apresenta características bioquímicas como: fermentação de glicose, com reação de oxidase negativa, utilização de citrato como fonte de carbono e produção de lisina-descarboxilase (KONEMAN *et al*, 2006).

A patogenicidade do gênero *Klebsiella* concentra-se em um grupo de fatores de virulência principais, como por exemplo: adesinas, pili, sideróforos e lipopolissacarídeos (LPS). Outro importante fator de virulência do gênero é o antígeno K, um polissacarídeo capsular expresso na sua superfície celular, atuando como ativador do sistema imune inato (RUSSO *et al.*, 2011).

K. pneumoniae é a principal espécie do gênero *Klebsiella* isolada de espécimes clínicos. Devido à grande similaridade fenotípica, atualmente essa espécie pertence ao complexo *K. pneumoniae* que inclui as espécies: *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae*, *K. quasipneumoniae subsp. similipneumoniae*, *K. variicola subsp. variicola*, *K. variicola subsp. tropicalensis*, *K. africanensis e K. quasivariicola* (RODRÍGUEZ-MEDINA *et al.*, 2019). A identificação precisa dessas espécies só é possível utilizando-se métodos moleculares ou plataformas de espectrometria de massa por tempo de vôo com ionização por laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS), porém é necessário que seus bancos de dados estejam atualizados (RODRIGUES *et al.*, 2018).

Em humanos, *K. pneumoniae* pode ser encontrada na microbiota do nariz, garganta, pele e trato intestinal de indivíduos saudáveis. Análises do estudo *Human Microbiome Project* realizado nos Estados Unidos identificaram a presença de *K. pneumoniae* em 4% das amostras de fezes e 10% das narinas de voluntários (CONLAN *et al*, 2012; MARTIN & BACHMAN, 2018). Já no meio ambiente, essa espécie está amplamente distribuída em água, esgoto, solo e plantas (WANG *et al*, 2020).

K. pneumoniae é considerada um patógeno oportunista, podendo ocasionar infecções adquiridas na comunidade, como infecções do trato urinário e pneumonia, além de infecções invasivas, como abscesso hepático piogênico e meningite (LAM *et al.*, 2021).

No ambiente hospitalar, esse microrganismo está amplamente associado às IRAS, podendo causar uma variedade de infecções, incluindo pneumonia, infecções de tecidos moles e feridas cirúrgicas, infecções do trato urinário, infecções na corrente sanguínea e sepse. Pode ser transferido por meio de equipamentos médicos e hemoderivados e ser transportado dentro do trato intestinal dos pacientes e na superfície das mãos e da pele dos profissionais de saúde (MARTIN & BACHMAN, 2018; MILLS *et al.*, 2016). Devido a sua habilidade em causar infecções graves associada à resistência antimicrobiana (RAM), *K. pneumoniae* representa uma séria ameaça à saúde pública (LAM *et al.*, 2021; MARTIN & BACHMAN, 2018 *et al.*, 2022).

A RAM pode ocasionalmente surgir através de mutações cromossômicas nessa espécie bacteriana, porém em sua maioria resultam da aquisição de genes de resistência antimicrobiana via transferência horizontal, principalmente através de grandes plasmídeos conjugativos (WYRES & HOLT,2018).

Os isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos podem causar infecções graves, como pneumonia e infecções da corrente sanguínea que podem evoluir para óbito. Por esse motivo, pertencem ao grupo crítico da lista prioritária de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC), criada pela OMS, que tem como finalidade orientar e promover a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos (OMS, 2017).

De acordo com o boletim da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do ano de 2022, *K. pneumoniae* foi o bacilo Gram-negativo mais isolado em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) adulto e infantil, proveniente de infecção primária de corrente sanguínea laboratorialmente confirmada (IPCSL) e o primeiro em infecções do trato urinário em UTI adulto. Com relação ao percentual de resistência aos carbapenêmicos, *K. pneumoniae* apresentou 76,8% de resistência nas IPCSL de pacientes em UTI adulto (ANVISA 2022). Atualizar para o ano de 2024.

O acúmulo de fatores de resistência em uma única linhagem bacteriana pode levar ao surgimento de cepas pan-resistentes, as quais apresentam resistência a todos os antibióticos atualmente disponíveis, tornando-as intratáveis (WYRES & HOLT, 2018).

De acordo com Gu e colaboradores (2018), as cepas de *K. pneumoniae* podem manifestar concomitantemente características de hiper virulência e resistência a múltiplos agentes antimicrobianos, culminando na emergência de linhagens convergentes. Esse fenômeno acarreta grandes desafios para a saúde pública.

Resistência aos antimicrobianos β-lactâmicos

Nas últimas décadas, houve um notável aumento de isolados de *K. pneumoniae* carregando múltiplos mecanismos de resistência aos antibióticos, no qual a resistência aos β -lactâmicos compreende o maior impacto no tratamento eficiente (MARTIN & BACHMAN, 2018).

Os β -lactâmicos são antimicrobianos bactericidas que possuem um anel β -lactâmico em sua estrutura química e são classificados em quatro famílias: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (MURRAY et al., 2004) (Figura 1).



Figura 1. Estrutura química da classe de β-lactâmicos

Fonte: adaptado de WILLIAMS,1999.

Os β-lactâmicos perduram como a classe mais utilizada clinicamente, em função da sua eficácia clínica, amplo espectro de ação e perfil de segurança favorável para o paciente, uma vez que, essa classe de antibióticos, atua especificamente inibindo a enzima transpeptidase, um alvo encontrado apenas em bactérias, o que minimiza os efeitos adversos. Como mecanismo de ação, os β-lactâmicos interferem diretamente na estrutura da parede celular, comprometendo a sobrevivência e reprodução das bactérias ao formar uma ligação covalente com as proteínas de ligação à penicilina (PBPs)(WALSH, 2003).

A penicilina foi acidentalmente descoberta em 1928 por Alexander Fleming (FLEMING,1929) e desde o seu isolamento, na década de 40, por Ernst Chain e Howard Florey, foi amplamente utilizada, salvando milhares de soldados e civis feridos durante a 2ª guerra (HEATLEY,2004).

A descoberta da penicilina alicerçou a era dos antibióticos e o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas (LOBANOVSKA & PILLA, 2017). Entre as décadas de 1950 e 1970, novas classes de antibióticos foram descobertas e usadas para o tratamento ou prevenção de

infecções humanas e animais, contudo o uso extensivo ao longo dos anos tem resultado no desenvolvimento de bactérias resistentes (SAKKAS *et al*, 2019).

Entre os mecanismos de resistência aos β -lactâmicos descritos incluem principalmente a produção de enzimas hidrolíticas (β -lactamases), alterações nas proteínas da membrana externa (PMEs) e as PBPs, bem como o aumento da atividade de bombas de efluxo (POIREL&NORDMANN, 2006).

Ambler (1980) classificou e categorizou as enzimas β -lactamase em 4 grupos (A, B, C, D) com base em seu domínio catalítico central: as enzimas das classes A, C e D possuem serina no sítio catalítico ativo, as classes A e D incluem enzimas que agem apenas sobre penicilinas até enzimas que hidrolisam todos os β -lactâmicos (carbapenemases), a classe C hidrolisa principalmente as cefalosporinas, enquanto as enzimas da classe B são metalo- β -lactamases (MBLs) que possuem zinco no sítio ativo e possuem atividade contra todos os β -lactâmicos com exceção dos monobactâmicos.

Bush & Jacob (2010) propuseram um outro tipo de classificação, baseada em subgrupos funcionais, e as enzimas foram agrupadas conforme a capacidade de hidrolisar β -lactâmicos e suas propriedades de inativação por inibidores de β -lactamase como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (tabela 1).

Classificação de Ambler	Bush Jacoby 2009	Características	Representantes	Inibido AC ou TZB	Inibido pelo EDTA
A	2a	Hidrolisa melhor benzilpenicilina que cefalosporinas.	PC1, TEM-1, TEM-2 SHV-1	sim	
	2b	Hidrólise similar das benzilpenicilinas TEM-90 e das cefalosporinas. Inibidas pelo AC ou TZB.	TEM-90		
A	2be	Aumento na hidrólise de cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima e aztreonam.	CTX-M-15, CTX-M-44 PER-1, SFO- 1,SHV-5,TEM- 10, TEM-26, VEB-1.	sim	
	2br	Resistência à AC, sulbactam e TZB.	TEM-30, TEM- 76, TEM- 103,SHV-10, SHV-26	-	-

Tabela 1. Classificação das β-lactamases segundo Ambler, Bush & Jacoby (continua)

	2ber	Aumento na hidrólise de oximino- beta-lactâmicos combinado com a resistência a AC, sulbactam e TZB.	TEM-50, TEM- 68	-	-
-	2c	Aumento na hidrólise de carbenicilina.	PSE-1, CARB-3	sim	
	2e	Hidrolisa cefalosporinas. inibidas pelo AC, mas não por aztreonam.	СерА	inibidas pelo AC, mas não por aztreonam.	
	2f	Enzimas que hidrolisam carbapenemas e possuem uma serina no seu sítio ativo.	KPC-2, KPC- 3,IMI-1, SME-1, GES-2	pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam	
B (B1)		Hidrólise de beta-lactâmicos de amplo			
B (B3)	3a	espectro, incluindo os carbapenêmicos, mas não os monobactâmicos.	IMP-1, VIM-1, L1, NDM-1	-	sim
B (B2)	3b	Hidrólise preferencial de carbapenemas.	CphA, Sfh-1	-	sim
С	1	Hidroliza melhor cefalosporinas que benzilpenicilinas; hidrolisa também as cefamicinas	AmpC , P99, CMY-2, FOX-1, MIR-1	não	não
	1E	Aumento na hidrólise de ceftazidimas, e outros oximinobeta- lactâmicos.	CMY-37	não	não
D	2d	Aumento na hidrolise de cloxacilina ou da oxacilina.	OXA-1, OXA- 10	Inibida por AC	-
	2de	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e oximino-betalactâmicos.	OXA-11, OXA- 15	v	_
	2df	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e carbapenêmicos.	OXA-23, OXA- 48	v	-

Legenda: CA= Ácido clavulânico, TZB= tazobactam V= variável Fonte: adaptado de BUSH & JACOBY, 2010

Outros inibidores de β-lactamases recentes, como Avibactam e Vaborbactam, inibem a atividade das enzimas de classes A, por exemplo KPC, e enzimas classe C, porém não inibem as enzimas das classes B e D (NORDMANN & POIREL, 2019).

O aumento do uso de antibióticos, desde a introdução das cefalosporinas de 3ª geração para uso clínico, no início da década de 1980, levou à disseminação de bactérias produtoras de β-lactamases de espectro estendido (ESBLs). As ESBLs são capazes de hidrolisar penicilinas, além das cefalosporinas de primeira geração (ex. cefazolina), terceira (ex. ceftazidima, ceftriaxona e cefotaxima), quarta geração (cefepime) e monobactâmicos, como o aztreonam. As ESBL mais difundidas em *K. pneumoniae* são as do grupo CTX-M e TEM (SARSHAR; MIRNEJAD; BABAPOUR, 2021; HOLT *et al*, 2015).

Devido às infecções graves causadas por bactérias produtoras de ESBL, na década de 90 ocorreu a introdução dos carbapenêmicos como a droga de escolha terapêutica (MARTIN & BACHMAN, 2018).

Resistência aos carbapenêmicos

Os carbapenêmicos, como imipenem e meropenem, são hidrossolúveis, têm baixa biodisponibilidade oral e em virtude de sua atividade de amplo espectro são frequentemente utilizados no tratamento de patógenos nosocomiais, principalmente contra Gram-negativos resistentes aos antibióticos (LIVERMORE, 1991; WALSH, 2003).

O uso contínuo de carbapenêmicos em bactérias Gram-negativas tem gerado resistência e causado uma epidemia global que continua a crescer (NORDMANN & POIREL, 2019). Com elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos, a resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae* representa um grande problema na saúde pública, uma vez que estes antimicrobianos são uma das últimas opções terapêuticas contra infecções causadas por bactérias multirresistentes (FANG *et al.*,2020).

Os autores BUSH & JACOBY (2010) citaram que a resistência aos carbapenêmicos pode surgir por diversos mecanismos conhecidos.

A reunião de fatores como a hiperprodução de enzimas ESBL ou AmpC (cefalosporinase cromossômica) combinado com a diminuição da permeabilidade da membrana externa, devido à perda ou a alteração das porinas, pode resultar na resistência aos carbapenêmicos. Muitas espécies de enterobactérias naturalmente produzem AmpC, como *Enterobacter spp., Serratia marcescens, Proteus spp., Providencia spp., Morganella morganii* e *Hafnia alvei*. (KACZMAREK *et al.*, 2006; NORDMANN & POIREL, 2019).

De acordo com Filgona e colaboradores (2015), os sistemas de efluxo são aspectos importantes e podem mediar a resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae*. Assim como mudanças na afinidade da ligação às enzimas-alvo (YIGIT *et al.*, 2001).

Contudo, o mecanismo de maior importância epidemiológica é a produção de carbapenemases, β -lactamases que são capazes de hidrolisar os carbapenêmicos e praticamente todos os beta-lactâmicos. A sua importância se deve a sua capacidade hidrolítica, bem como pela localização dos genes de resistência em elementos genéticos móveis, conferindo uma rápida disseminação (LEE *et al*, 2016).

As carbapenemases podem pertencer às classes A, B e D de Ambler (NORDMANN & POIREL, 2019).

As MBLs (classe B) são encontradas em diversas espécies Gram-negativas e compreendem um grupo que inclui as enzimas adquiridas, como por exemplo: VIM, IMP e NDM. Essas enzimas podem ser inibidas por EDTA e ácido dipicolínico (DPA) (NORDMANN & POIREL, 2019).

As oxacilinases (OXA - classe D), compreendem um grupo heterogêneo com atividades significativas de carbapenemases. Esse grupo inclui as enzimas do tipo OXA-48, importantes em Enterobacterales e OXA-23, frequentemente encontradas em *Acinetobacter baumannii* (NORDMANN & POIREL, 2019).

A maioria das enzimas serino-carbapenemase da classe A não demonstram atividade de carbapenemase, porém é importante ressaltar que nesta classe, encontra-se a enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), a carbapenemase mais disseminada no mundo em Enterobactelares, que têm atividade hidrolítica contra todos os β -lactâmicos e podem estar localizadas tanto no cromossomo quanto em plasmídeos (TOOKE *et al.*, 2019).

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)

A enzima KPC pertence à classe A e é capaz de hidrolisar os β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas, cefamicinas, monobactâmicos e ácido clavulânico. Podem ser inibidas por avibactam, vaborbactam e relebactam (YIGIT *et al*, 2001; WYRES & HOLT, 2018).

Como a produção de KPC resulta em um fenótipo de resistência dos β -lactâmicos e outros antibióticos, as opções terapêuticas disponíveis são limitadas, o que transformou as cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC em um dos patógenos contemporâneos mais

preocupantes, devido a sua disseminação em quase todos os continentes (DA SILVA *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2016).

Nos anos 2000, foram identificadas duas novas variantes do KPC-1 com mutações pontuais, denominadas respectivamente de KPC-2 e KPC-3. A variante KPC-2 foi inicialmente identificada em 2003, porém, após uma investigação detalhada das sequências dos genes que codificam as enzimas, foi observado que houve um erro na publicação inicial dessa carbapenemase, concluindo-se que a sequência da KPC-2 era idêntica à da KPC-1. A partir disso, a nomenclatura KPC-2 passou a ser adotada e o uso da nomenclatura KPC-1 foi abandonada (SMITH et al., 2003).

Até a data de 31/01/2024, foram identificados 192 alelos de KPC. Esta informação foi obtida por meio de consultas aos bancos de dados de β -lactamases disponíveis em sites como <u>http://bldb.eu/BLDB.php?prot=A#KPC</u> e no NCBI em <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OR529436?from=1&to=912</u>.

Desde que a primeira variante KPC foi descrita em 1996 na Carolina do Norte, Estados Unidos (EUA), as bactérias produtoras desta enzima, têm emergido rapidamente como um grave problema em diversas países do mundo como por exemplo: Colômbia, Equador, Polonia, Croácia, EUA, Canadá, China, dentre outros (ROJAS *et al.*, 2018; PRADO-VIVAR *et al* 2019; BARANIAK *et al.*, 2017; BEDENIĆ *et al.*, 2021 SATLIN *et al.*, 2017; TIJET *et al.*, 2014; FU *et al.*, 2019).

No ano de 2006, houve o primeiro relato de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 no Brasil. Essas cepas foram recuperadas de pacientes internados em UTI de um hospital localizado no Recife (PE). Adicionalmente, as cepas também coproduziam a ESBL CTX-M-2, veiculadas por plasmídeo, o que facilitaria sua disseminação, principalmente quando presente em um microrganismo conhecido por sua habilidade em acumular e transferir determinantes de resistência como *K. pneumoniae* (MONTEIRO *et al.*, 2009).

O gene bla_{KPC-2} já foi descrito em outras espécies de Enterobacterales distribuídas pelo país, contudo *K. pneumoniae* é a espécie mais frequentemente associada à produção de carbapenemases (RARO *et al.*, 2020).

Estabrooks e colaboradores (2023), com objetivo de descrever a frequência de determinantes de resistência em isolados de Enterobacterales não suscetíveis a meropenem coletados entre 2018 e 2019, relataram que entre os isolados resistentes coletados na América Latina e América do Norte a KPC foi a mais constantemente identificada, com 53,9% (216/401) e 53,6% (59/110) dos isolados positivos para a carbapenemase, respectivamente.

A disseminação mundial da carbapenemase KPC tem sido associada à mobilização do gene *bla*_{KPC} através de elementos genéticos móveis, como o transposon Tn4401 e transferência horizontal de plasmídeos. Essas enzimas têm sido predominantemente relatadas em vários membros de Enterobacterales, causando infecções graves e surtos devido a esta localização em elementos móveis, permitindo sua transferência e disseminação entre uma ampla gama de bacilos Gram-negativos (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2019; CHERUVANKY *et al.*, 2017).

O gene *bla*_{KPC} é encontrado em muitos plasmídeos diferentes e amplamente disperso não só entre Enterobacterales, mas também em bacilos não-fermentadores, como *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. No entanto, *K. pneumoniae* produtoras de KPC protagonizam a maioria das infecções oportunistas no ambiente hospitalar, sendo consideradas mais relevantes clinicamente, devido a sua disseminação global (WYRES & HOLT,2018; TOOKE *et al.*, 2019).

Além do importante papel dos elementos genéticos móveis na disseminação mundial de KPC, também tem sido descrito a participação de clones de alto risco, como o clone bemsucedido, CC11, responsável pela disseminação de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos em todo o mundo, que pode ser encontrado tanto em isolados hospitalares, quanto comunitários (BUSH & BRADFORD, 2020).

Atualmente, no Brasil, a presença de *K. pneumoniae* produtora de KPC é considerada endêmica, e estudos moleculares têm demostrado que a maioria dos isolados pertence ao CC11 (AIRES *et al.*, 2020; CONCEIÇÃO-NETO *et al.*, 2022).

O tratamento ótimo para infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de KPC permanecem incertos, a maioria dos estudos sobre esse tópico revelaram uma disponibilidade limitada de opções de antibióticos. A identificação rápida dos mecanismos de resistência específicos pode ser crucial para guiar a implementação de terapias eficazes e direcionadas contra esses mecanismos de resistência específicos. É importante ressaltar que a terapia empírica inadequada para a infecções por *K. pneumoniae* produtora de KPC pode gerar impactos negativos na mortalidade (BASSETTI & PEGHIN 2020).

A avaliação da clonalidade das cepas bacterianas pode ser conduzida por meio de ferramentas moleculares, tradicionalmente, o PFGE foi amplamente reconhecido como o padrão-ouro. Desenvolvimentos mais recentes na tipagem bacteriana, incluem o uso de sequenciamento completo do genoma (*WGS*), que proporciona uma visão mais abrangente e detalhada da clonalidade. Ademais a técnica de MALDI-TOF também tem sido considerada uma provável alternativa para tipagem bacteriana (NEOH *et al.*, 2019; BOGGS *et al.*, 2012). PFGE (*Pulsed-field gel electrophoresis*)

A técnica de PFGE, *Pulsed-field Gel Electrophoresis*, traduzido do inglês, eletroforese de gel em campo pulsado, é considerada um método de terceira geração para tipagem molecular de bactérias. Esta técnica de tipagem bacteriana é uma ferramenta importante para investigação de surtos, vigilância e filogenética, podendo ser utilizada para monitorar a disseminação e a diversidade genética de patógenos nosocomiais, como *K. pneumoniae* (LI; RAOULT; FOURNIER, 2009).

O método envolve a utilização de enzimas de restrição, que apresentam sítios raros no genoma estudado. Após a clivagem do genoma, os grandes fragmentos de DNA gerados são submetidos a eletroforese onde estes se movimentam e se separam na reorientação periódica dos campos elétricos, em um gel de agarose, como pode ser observado na figura 2. Dependendo do tamanho molecular de cada fragmento, são gerados padrões de bandas de PFGE, que servem de base para atribuição do perfil de fragmentação das cepas (NEOH *et al.*, 2019).

Eletroforese em campo pulsado permite uma separação mais visível dos fragmentos de DNA de vários tamanhos (de kb a Mb), resultando em melhor tipagem e atribuição clonal das bactérias testadas, visto que os genomas bacterianos têm um tamanho de 2 a 4 Mbp (NEOH *et al.*, 2019).

Embora existam variadas técnicas utilizadas na tipagem de bactérias, até o presente momento o PFGE tem sido considerado o "padrão ouro" para estudos epidemiológicos, por apresentar um grande poder discriminatório (HASHEMIZADEH *et al.*, 2020).



Figura 2. Campos eletroforéticos e reorientação do DNA na técnica de PFGE

Legenda: a) Campos eletroforéticos em gel de agarose;b) reorientação do DNA através de pulsos periódicos Fonte: NEOH *et al.*, 2019 (Adaptado)

Atualmente, métodos fundamentados no sequenciamento de genoma completo (WGS) também têm sido empregados com êxito na investigação de relações filogenéticas e na detecção de clones. Essa abordagem molecular sofisticada tem sido valiosa para elucidar a evolução e disseminação de clones de *K. pneumoniae*, fornecendo informações cruciais para o entendimento da epidemiologia e da evolução deste microrganismo (HOLT *et al.*, 2015).

Multilocus Sequence Typing (MLST)

O esquema MLST, do inglês *Multilocus Sequence Typing*, é utilizado para caracterizar a diversidade genética e relacionamentos filogenéticos entre diferentes isolados. Foi primordialmente proposto para a identificação de genótipos bacterianos fortemente relacionados filogeneticamente, onde pela primeira vez foi possível desenvolver um banco de dados de tipagem de patógenos mundial, facilmente acessível às comunidades de pesquisa devido à reprodutibilidade e à portabilidade da técnica de MLST (MAIDEN *et al.*, 1998).

O princípio básico do esquema MLST envolve a análise do sequenciamento de cerca de sete genes *housekeeping*, traduzido do inglês para gene de manutenção, que são considerados genes que desempenham funções essenciais para o metabolismo celular de determinada espécie e, portanto, estão sujeitos a menor pressão seletiva (URWIN & MAIDEN, 2003).

As diferentes sequências, para cada gene de manutenção, são atribuídas como alelos distintos e, para cada isolado, a sequência de alelos encontrada em cada um dos sete *loci* definem o perfil alélico ou *sequence type* (ST), traduzido do inglês sequência tipo (MAIDEN *et al.*, 2013).

Diancourt e colaboradores (2005) descreveram um esquema de tipagem MLST desenvolvido para *K. pneumoniae*, baseado nas sequências de sete genes *housekeeping: rpoB* (Subunidade beta da RNA polimerase B), *gapA* (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), *mdh* (malato desidrogenase) *pgi* (Fosfoglicose isomerase) *phoE* (Fosfoporina E), *infB* (Fator de iniciação da tradução 2) e *tonB* (Transdutor de energia periplásmica).

Estudos epidemiológicos revelaram que o complexo clonal 11 (CC11) é um dos clones primários que se disseminaram pelo mundo, dentre os quais ST11 é o clone com papel importante, capaz de desenvolver resistência a agentes antimicrobianos e carregar plasmídeos de virulência, que beneficiam sua sobrevivência no hospedeiro (JIN *et al.*, 2021).

Em um dos primeiros relatos do ST258 (pertencente ao CC11) carreando o gene *bla*_{KPC-2} nos EUA, Kitchel e colaboradores (2009) detectaram que 70% dos isolados, provenientes de 16 estados americanos, no período de 1996 a 2008, pertenciam ao clone ST258. Após essa descrição, esse clone foi detectado em diversos locais espalhado pelo globo, como na Europa e Israel (ÖSTERBLAD, *et al* 2009; SAMUELSEN, *et al* 2009; GIANI, *et al.*, 2009; NAVON-VENEZIA et al., 2009), na Ásia (ROH *et al.*, 2011) e na América Latina (MARQUEZ, *et al* 2014).

No Brasil, um estudo utilizando sequenciamento de genoma total, em cepas de *K. pneumoniae* isoladas de infecções de corrente sanguínea, destacou a presença do ST258 circulando no território brasileiro (SILVEIRA *et al.*, 2021).

Sendo assim, a disseminação mundial da *K. pneumoniae* produtora de KPC pode ser atribuída à expansão das linhagens do grupo clonal CC11, que circula em mais de 20 países e contém mais de 43 ST diferentes (CHEN *et al.*, 2014).

MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry)

Os métodos tradicionais para identificação de microrganismos, como bactérias ou fungos, envolvem a cultura e isolamento, com análise subsequente de suas características tintoriais e a morfologia das colônias, juntamente com o comportamento em testes bioquímicos específicos. O tempo necessário a partir da entrega da amostra clínica ao laboratório de microbiologia até obtenção deste resultado demanda de 36 a 48 horas (ANWER *et al.*,2022).

Mesmo com o advento dos sistemas automatizados, o resultado pode demorar mais de 24 horas. Como consequência dessa demora, esse resultado pode perder o impacto clínico e postergar a correta terapia antimicrobiana no tratamento do paciente (VEENEMANS *et al.*, 2016).

Alguns microrganismos sequer podem ser facilmente identificados usando métodos tradicionais, o que pode demandar do uso de diagnóstico molecular como por exemplo, sequenciamento rDNA 16S. Nestes casos o tempo aumenta consideravelmente se o crescimento do microrganismo for fastidioso (DIXON *et al.*, 2015).

Um dos grandes avanços na microbiologia clínica foi a utilização da espectrometria de massa (MALDI-TOF MS), para a identificação das espécies bacterianas. Uma metodologia que

agilizou esse processo, permitindo a obtenção do resultado em poucas horas. Existem dois principais sistemas de identificação microbiana baseados em espectrometria de massa (MS): o *BioTyper*® (Bruker Daltonics) e o *VITEK*® *MS Plus* (BioMérieux). Ambas as plataformas utilizam a técnica MALDI-TOF MS, que consiste na análise e detecção de um amplo espectro de proteínas, permitindo a distinção entre espécies intimamente relacionadas. Esses sistemas têm se mostrado eficazes na identificação precisa e rápida de microrganismos, contribuindo significativamente para o diagnóstico clínico (CARBONELLE *et al.*, 2011).

Há muito tempo, estudiosos usufruem da espectrometria de massa para análises químicas. O primeiro relatório utilizando espectrometria de massa para caracterizar bactérias foi descrito por Anhalt e Fenselau, embora na época não obtiveram sucesso em analisar proteínas intactas, em razão da fragmentação das proteínas no processo (ANGELETTI, 2017).

Nos anos 80, aconteceram pesquisas importantes para o cenário da utilização de espectrometria de massas para análise de macromoléculas biológicas. Em 1985, Koichi Tanaka descreveu um método chamado de "ionização por dessorção suave" usando pó de metal ultrafino e glicerol, que permitiu que as macromoléculas biológicas ficassem intactas. Posteriormente, ele foi premiado com o Prémio Nobel de Química (TANAKA, 2003).

Os pesquisadores Franz Hillenkamp e Michael Karas desenvolveram a ionização por dessorção suave utilizando uma matriz de compostos orgânicos, destacando o termo ionização por dessorção a laser assistida por matriz, cuja sigla é MALDI do inglês "*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*" (FUH *et al.*, 2017).

Para análises de peptídeos com aplicações microbiológicas, uma fonte é acoplada a um detector *TOF* (*Time of Flight*). Durante a análise do MALDI-TOF, o laser é irradiado em direção a colônia previamente ionizada com a matriz, que vaporiza e libera íons, como pode ser observado na figura 3. A razão massa-carga (m/z) de um íon é medida de acordo com o tempo necessário para que ele percorra o comprimento do tubo de "vôo" (PATEL, 2019).

O espectro de massa é gerado a partir do número de íons que impactam o detector ao longo do tempo. O procedimento fornece uma impressão digital de espectros de massa que é única para cada microrganismo (ANGELETTI, 2017).



Figura 3. Funcionamento do aparelho de MALDI-TOF

Fonte: Adaptado de PATEL, 2019

A tecnologia do MALDI-TOF evoluiu mostrando-se uma ferramenta inovadora, precisa, fácil de usar, além de proporcionar uma rápida identificação bacteriana em comparação com os métodos convencionais, que se baseiam na análise fenotípica do metabolismo dos microrganismos e o resultado pode demorar mais de 24 horas. Muitos laboratórios clínicos adquiriram sistemas de MALDI-TOF, com intuito de agilizar o início da terapia (CLARK *et al.*, 2013).

Além da utilização da identificação rápida e precisa de microrganismos através de MALDI-TOF, essa ferramenta também tem sido investigada para distinguir entre cepas resistentes e suscetíveis a antibióticos, cepas virulentas e não virulentas dentro de uma mesma espécie, além do uso para tipagem epidemiológica, visto que, nesse contexto a capacidade de realizar uma tipagem rápida pode ser utilizada para avaliar a extensão de um surto, origens, fontes, reservatórios e disseminação de infecções bacterianas, o que seria de grande importância no âmbito clínico (BERRAZEG *et al.*, 2013;VEENEMANS *et al.*, 2016;).

Devido a rapidez e acurácia na obtenção dos resultados, e a obtenção de um perfil de espectros de massa, alguns estudos têm proposto a utilização do MALDI-TOF para a identificação da clonalidade de amostras bacterianas. A rápida identificação da presença dos clones epidêmicos de *K. pneumoniae* são essenciais para auxiliar nas medidas de prevenção e controle da disseminação nos hospitais. Assim, é imprescindível que novas alternativas para o a avaliação da clonalidade dos isolados bacterianos, sejam estudadas (NEOH *et al.*,2019).

A técnica de MALDI-TOF foi considerada, por alguns autores, como uma alternativa promissora nos métodos de tipagem bacterianas baseados em gel, devido à preparação descomplicada da amostra que será estudada, além da obtenção rápida dos resultados (SAUGET *et al.*, 2017).

O uso da técnica de MALDI-TOF com intuito da observação da similaridade entre os espectros bacterianos, para posterior utilização desta ferramenta como tipagem e identificação de clones de risco, foi pesquisada em diferentes espécies de bactérias tanto Gram positivas, tais como: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, quanto para Gram negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* (MOURA *et al.*, 2008; BOGGS *et al.*, 2012; REIL *et al.*, 2011; KARGER *et al.*, 2011;KUHNS *et al.*, 2012).

Dos métodos de tipagem genômica, MLST e PFGE, são dois métodos de referência que tiveram progressos significativos alcançados na caracterização precisa de populações de *K. pneumoniae*, bem como metodologias de tipagem de cápsula (tipagem K) e o sequenciamento de genoma completo (WGS). Contudo, esses métodos são geralmente dispendiosos, demorados ou requerem habilidades técnicas avançadas, dificultando sua aplicação de rotina (ANGELETTI, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2017).

Outros métodos alternativos para a tipagem de *K. pneumoniae* foram explorados, dentre eles o uso da ferramenta MALDI-TOF, mas até o momento, seu uso tem sido limitado a coleções pequenas ou aleatórias de isolados e utilizando diversos fluxos de trabalho de análise, resultando em resultados discriminatórios abaixo do ideal ou com baixa reprodutibilidade (RODRIGUES *et al.*, 2017).

Dessa forma, pesquisas que envolvam uma amostragem mais abrangente e que investiguem a viabilidade da aplicação da técnica MALDI-TOF para a tipagem molecular em *K. pneumoniae* produtoras de KPC podem se revelar de grande utilidade em contextos relacionados à avaliação de surtos e monitoramento, permitindo assim medidas de controle.

1 **OBJETIVOS**

1.1 **Objetivo geral**

O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia da tecnologia MALDI-TOF na análise da diversidade clonal de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC, provenientes de diferentes regiões do Brasil.

1.2 **Objetivos específicos**

- a) Confirmar a identificação das cepas através de MALDI-TOF
- b) Confirmar a presença do gene blaKPC nas amostras selecionadas
- c) Avaliar a relação de clonalidade dos isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC selecionados utilizando as técnicas de PFGE e MLST;
- d) Avaliar a capacidade do MALDI-TOF em estabelecer a diversidade clonal das amostras selecionadas;
- e) Correlacionar os resultados obtidos com a tipagem molecular por MALDI_TOF com o PFGE e MLST

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção e preparação das cepas para o estudo

O LabSUR atua como Centro Colaborador na Rede de Monitoramento de Resistência aos Antimicrobianos da ANVISA e Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB/SVS/MS) realizando testes de caracterização fenotípica e molecular de genes de resistência e avaliação de surtos.

Para o presente estudo, foram selecionadas cepas de *K. pneumoniae* recebidas pelo LabSUR entre os meses de janeiro e dezembro do ano de 2021, previamente identificadas como positivas para o gene *bla*_{KPC}. As amostras duplicadas foram excluídas. Esses isolados foram recuperados do acervo do LabSUR, onde foram mantidos a -30°C em caldo BHI (Oxoid, UK) acrescido de glicerol 2% (Sigma-Aldrich, EUA) até a sua utilização. Após a confirmação da pureza das cepas, os experimentos foram realizados a partir de colônias obtidas por semeadura por esgotamento em ágar nutriente (Oxoid, Hampshire, UK), que foram incubadas por 18 a 24 horas a 37 °C em estufa bacteriológica.

2.2 Identificação confiável das cepas através do aparelho de MALDI-TOF

A confirmação da espécie foi realizada através da metodologia de espectrometria de massa MALDI-TOF, utilizando o equipamento MALDI-TOF MS Bruker Microflex LT/SH localizado na plataforma do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) dentro do campus FIOCRUZ/RJ.

A calibração diária foi realizada pelos funcionários da plataforma, de acordo com as instruções do fabricante (Bruker Daltonik), utilizando o extrato comercial padronizado de proteínas ribossomais de *E. coli*, denominado *Bruker bacterial test standard* (BTS).

Para o controle negativo, foram utilizados pontos aleatórios distribuídos na *target plate* MSP 96 ®, uma placa analisadora de aço inoxidável polido com 96 poços (modelo MTX-96 -Bruker Daltonics), contendo apenas uma solução composta da matriz de dessorção (ácido aciano-4-hidroxicinâmico [a-HCCA]) diluído em *Bruker standard solvent* (50% acetonitrila [ACN] + 47.5% H₂O + 2.5% ácido trifluoroacético [TFA]).

2.2.1 Extração direta para identificação das cepas

Para garantir que o banco de dados comercial do MALDI-TOF MS BioTyper® (Bruker Daltonics) ofereceria uma identificação confiável das cepas de *K. pneumoniae* escolhidas para o estudo, foi realizado o método de extração direta.

As cepas foram semeadas por esgotamento em ágar nutriente (OXOID) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24h. Após esse período, uma pequena parte de uma colônia bacteriana foi inserida na *target plate* MSP 96 ® com auxílio de um palito de madeira. A placa analisadora permaneceu em temperatura ambiente até a secagem. Em seguida, cada poço foi tratado com 1 µL ácido fórmico (Sigma-Aldrich, EUA) e após secagem foi coberto com 1 µl de matriz HCCA (Sigma-Aldrich, EUA). Após essa etapa, a *target plate* MSP 96 ® foi mantida em temperatura ambiente para secagem e posterior cristalização. Prontamente, a placa contendo as amostras preparadas foi inserida no equipamento MALDI-TOF MS Bruker Microflex LT/SH (Bruker Daltonik GmbH & Co. KG, Alemanha).

2.2.1.1 Obtenção e análise dos espectros de massa para identificação das cepas

A obtenção e análise dos espectros de massa foram determinados de acordo com as configurações padrão recomendadas pelo fabricante dos programas FlexAnalysis versão 3.3 e MALDI–Biotyper versão 3.1 (Bruker Daltonics GmbH®, Leipzig, Alemanha), utilizando modo de aquisição automático, íon linear e positivo, frequência do laser de 60 Hz, tensão da fonte de íons 1, 20 kV, tensão da fonte de íons 2, 16,7 kV, tensão da lente, 7,0 kV e a relação de massa\carga na faixa de massa, 2.000 a 20.000 Da.

Os dados gerados foram analisados de forma automatizada usando o *software* FlexControl v3.4 (Bruker Daltonics GmbH[®], Leipzig, Alemanha). As cepas com pontuações \geq 2,0 foram aceitas como uma identificação confiável ao nível de espécie e pontuações entre \geq 1,7, mas <2,0 foram aceitas para identificação ao nível de gênero. Pontuações abaixo de 1,7
foram consideradas não confiáveis, conforme o especificado pelo fabricante (Bruker Daltonik GmbH & Co. KG, Alemanha) (Tabela 2).

Tabela 2. Significado da pontuação e categorias obtidas através do Módulo flexAnalysis do MALDI-TOF MS

Intervalo	Interpretação	Símbolos	Cores
2.00 - 3.00	Identificação de alta confiança	(+++)	verde
1.70 - 1.99	Identificação de baixa confiança	(+)	amarelo
0.00 - 1.69	Não é possível a identificação do organismo	(-)	vermelho

Fonte: Adaptado do manual do usuário do MALDI Biotyper CA System.

2.3 Confirmação da presença do gene blakpc

2.3.1 Extração de ácido desoxirribonucleico (DNA)

A confirmação da presença do gene bla_{KPC} foi realizada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional (MONTEIRO *et al.*, 2012).

A extração de DNA das cepas foi realizada através de lise mecânica por sonicação. Para isso, em um microtubo de polipropileno de 1,5 mL foram adicionados 500 µl de água destilada ultrapura (Invitrogen, EUA) e foi acrescentado de 1 a 2 colônias, obtidas de um crescimento puro em ágar nutriente (OXOID). A suspensão obtida foi homogeneizada em vórtex por aproximadamente 15 segundos e em seguida, foi submetida à sonicação, utilizando a cuba de banho de ultrassom Cristófoli (Paraná, Brasil) durante 30 segundos por três vezes, sendo homogeneizada no intervalo entre as sonicações. Para obtenção do sobrenadante contendo o DNA, a suspensão foi centrifugada a 13.000 rpm por três minutos. Após isso, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de polipropileno de 1,5 mL, mantido a -20°C até o seu uso.

Para amplificação do gene codificador *bla*_{KPC}, cujo fragmento amplificado possuía 1011pb usando as sequências de iniciadores (5'- 3'): **KPC-F**: TGTCACTGTATCGCCGTC e **KPC-R**: CTCAGTGCTCTACAGAAAAACC (Yigit et al., 2001), foi preparada uma reação utilizando Master Mix (Promega, EUA), com quantidade de cada reagente descrita na tabela 3.

A amplificação ocorreu no aparelho termociclador (Biorad, EUA) perante as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão à 72°C por 1 minuto. Por fim, extensão final a 72°C por 5 minutos. Como controle positivo para os genes investigados foi utilizado a cepa CCBH6556 (*bla*_{KPC2}-positiva) pertencente à Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar (CCBH-IOC).

Reação de PCR	Quantidade (µl)
Master Mix (Promega, EUA)	12,5
Água ultrapura (Invitrogen, EUA)	9,5
Iniciador R (10 pmol)	0,5
Iniciador F (10 pmol)	0,5
DNA extraído	2,0
Total	25

Tabela 3. Reação para detecção de gene codificador da carbapenemase *bla*_{KPC} através da PCR convencional

Fonte: A autora, 2023.

2.3.3 <u>Eletroforese em gel de agarose</u>

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen, EUA) em TBE 0,4X (EDTA 0,5M pH 8,0; Tris 1M pH 8,0; Ácido Bórico 0,035M). A corrida eletroforética ocorreu nas seguintes condições: tampão TBE 0,4X sob corrente de 100 Volts, por 45 minutos. Após a corrida, o gel foi corado com GelRed (Biotium) e finalmente observado sob luz ultravioleta usando o fotodocumentador L-Pix EX (Loccus Biotecnologia) e o *software* de captura de imagem L-Pix Image (Loccus Biotecnologia).

2.4 Determinação da diversidade genética através de PFGE

As amostras foram submetidas à tipagem molecular pela técnica de PFGE, conforme protocolo descrito por Ribot e colaboradores (2006), com adaptações.

2.4.1 Aprisionamento das células em blocos de agarose (plug)

As amostras foram semeadas em tubo contendo ágar nutriente inclinado (Oxoid) e incubadas a 37°C por período de 18 a 24 horas.

No dia seguinte, as células foram colocadas em tubos de poliestireno (Falcon; 13×75 mm) contendo 1mL da solução BSC (Tris 100mM, EDTA 100 mM [pH 8,0]). Para obtenção de suspensões na escala 3,0 de MacFarland, suas densidades ópticas foram ajustadas com auxílio do aparelho DensiCHEKTM Plus Standards (BioMérieux, França). Posteriormente, uma alíquota de 200 µL da suspensão bacteriana foi transferida para um microtubo, onde, em seguida, foram adicionados 5 µL de proteinase K 50 mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e homogeneizado. À suspensão bacteriana foi acrescentado 200 µL da agarose *low melting Seakem Gold* (Lonza, Atlanta, EUA) a 1% contendo SDS (1%) para a obtenção dos blocos de agarose (plugs).

Para o preparo da agarose *low melting Seakem Gold* (Lonza, Atlanta, EUA) a 1% foi utilizado 0,1 g de agarose dissolvida em tampão Tris-EDTA (9,4 mL Tris 10 mM, EDTA 1mM [pH 8,0]) e posteriormente, foi adicionado 0,5 mL de SDS à 20% (solução de dodecil sulfato de sódio Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

A mistura (suspensão bacteriana em BSC + agarose com SDS) foi homogeneizada e adicionada imediatamente ao molde de plug (Bio-Rad, Berkeley, EUA), que foram deixados em temperatura ambiente até a solidificação. Os plugs foram retirados dos moldes, vertidos em tubo cônico de polipropileno de 15mL contendo 2 mL de solução de lise (Tris 50 mM, EDTA 50 mM [pH 8,0], N-Lauril sarcosil 10% [Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA]) e 5 μ L de proteinase K (Sigma-Aldrich).

Os tubos contendo os plugs foram incubados em banho-maria a 50°C por 2 horas. Após o período de incubação, foram realizadas 3 lavagens que ocorreram a cada 10 minutos com água Mili-Q, em banho-maria a 50°C, seguida da última lavagem com tampão TE estéril (Tris

1M pH 8,0, EDTA 0,5 M [pH 8,0], H₂O Mili-Q). Os blocos foram armazenados em 2 mL de TE estéril em refrigeração (2 a 8°C) até o período da sua utilização.

2.4.2 Digestão enzimática

Foi realizado, com auxílio de um bisturi, um corte de aproximadamente 1/3 do plug original, que posteriormente foi acomodado em um microtubo de polipropileno contendo 50 μL do tampão 1X da enzima *XbaI* (Promega, EUA), onde permaneceram por 30 minutos a 4°C. Em seguida, os plugs foram submetidos à restrição enzimática utilizando 3μL da enzima *XbaI* (20U) (Promega, EUA) por 3 horas a 37°C.

2.4.3 Separação dos fragmentos através de corrida eletroforética

Os blocos (plugs) de agarose foram acomodados em um suporte com pentes que serviram como molde para produzir 15 poços. Nos poços das sequências 2 a 14 foram inseridas as amostras estudadas e nos poços de números 1 e 15 foram incluídos o padrão de peso molecular para PFGE, Lambda PFG Ladder N034K 50-1.000 kb (New England Biolabs, Massachusetts, EUA). Subsequentemente, o suporte contendo o pente com os plugs foi acoplado ao molde e adicionado agarose Seakem Gold (Lonza, Atlanta, EUA) a 1,1% em tampão TBE 0,4X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 0,5 mM, [pH 8,0]) na temperatura de aproximadamente 50°C, até a solidificação do gel.

Para separação dos fragmentos, o gel de agarose foi submetido a corrida eletroforética, utilizando o sistema CHEF (Contour-clamped Homogeneous Electrical Field) DRIII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Foram aplicadas as seguintes condições: tempo de pulso crescente de 0,5 segundos (inicial) a 35 segundos (final), por 18 horas, com miliamperagem de 6V/cm, na temperatura de 14°C, em tampão de TBE 0,4X. Posteriormente à corrida, o gel foi corado utilizando GelRed (Biotium), observado sob luz ultravioleta usando o fotodocumentador L-Pix EX (Loccus Biotecnologia) e o *software* de captura de imagem L-Pix Image (Loccus Biotecnologia).

2.4.4 <u>Análise dos perfis de fragmentação do DNA para avaliação da diversidade clonal</u>

A análise dos perfis de fragmentação do DNA e avaliação da diversidade clonal foi realizada através de dendrograma gerado no *software* BioNumerics versão 6.6 (Applied-Math, Kortrijk, Bélgica). As imagens dos géis de agarose foram capturadas e convertidas para arquivos TIFF para serem analisadas. A análise de similaridade dos padrões PFGE foi realizada calculando os coeficientes de Dice e a correlação para agrupamento foi calculada por UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) considerando a otimização de 1.0% e tolerância de 1.5%. Foi utilizado o parâmetro de $\geq 85\%$ de similaridade para considerar os perfis de fragmentação como pertencentes ao mesmo grupo clonal.

2.5 Determinação da diversidade genética por meio de MLST

Para determinação de MLST (*Multilocus Sequence Typing*), foi escolhido o protocolo número 2 do esquema disponível no banco de dados *Institut Pasteur MLST Database* (<u>http://www.pasteur.fr/mlst/</u>), um protocolo simplificado no qual utiliza-se primers de sequenciamento universal onde a temperatura de anelamento para todos os genes é de 50°C.

Após crescimento de 24h em caldo BHI, foi realizada a extração do DNA bacteriano com o auxílio do *Kit* QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante. Foi adicionado 2 μ l do DNA extraído ao *mix* de PCR elaborado com volume final de 25 μ L, conforme descrito anteriormente na tabela 3, e em seguida foi submetido à amplificação dos 7 genes conservados descritos na tabela 4.

Utilizando-se termociclador LOCCUS, as condições de amplificação empregadas foram as equivalentes para todos os sete genes: 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos. Por fim, extensão final a 72°C por 5 minutos

Os produtos obtidos foram purificados utilizando *Kit* GFX[™] PCR *DNA Purification* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante. Subsequentemente, foram submetidos ao sequenciamento nas duas direções a fim de aumentar a segurança dos

resultados, no qual utilizou-se 1 µl dos *primers* de sequenciamento universal listados na tabela 4 para a determinação do *sequence typing* (ST).

Tabela 4. Primers para amplificação através de PCR do Protocolo número 2 do Instit	uto
Pasteur (continua)	

Gene/pb	Direção	Sequência
rpoB(Vic) /	F:Vic3oF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGGCGAAATGGCWGAGAACCA
545	R:Vic2oR	TTGTGAGCGGATAACAATTTC GAGTCTTCGAAGTTGTAACC
gapA/494	F:gapA173oF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATGAAATATGACTCCACTCACGG
	R:gapA181o R	TTGTGAGCGGATAACAATTTC CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT
mdh/521	F:mdh130oF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA CCCAACTCGCTTCAGGTTCAG
	R:mdh867oR	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCCGTTTTTCCCCAGCAGCAG
pgi/476	F:pgi1FoF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGAGAAAAACCTGCCTGTACTGC TGGC
	R:pgi1RoR	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAA T
phoE/464	F:phoE604.1 oF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGCAACACCGACTTCTT CGG
	R:phoE604.2 oR	TTGTGAGCGGATAACAATTTC TGATCAGAACTGGTAGGTGAT
infB/362	F:infB1FoF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTCGCTGCTGGACTATATTCG
	R:infB1RoR	TTGTGAGCGGATAACAATTTC CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC
tonB/458	F:tonB1FoF	GTTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTTTATACCTCGGTACATCAGGT
	R:tonB2RoR	TTGTGAGCGGATAACAATTTCATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG
Iniciadores universais de	F:primer oF:	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
sequenciame	R:primer oR:	TTGTGAGCGGATAACAATTTC

Notas: 1- Em negrito, são as caudas com sequências nucleotídicas universais.

2- Como foram utilizados os iniciadores universais, foi considerado um aumento de 44 nt a cada tamanho de produto de acordo com Protocolo 2 do esquema de MLST para *K. pneumoniae*.

Fonte: Institut Pasteur MLST Database (http://www.pasteur.fr/mlst/).

nto

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o *BigDye Terminator* v3.1 *Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) e o sequenciamento foi realizado na Plataforma de Sequenciamento de DNA-PDTIS, localizada no Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática do IOC-FIOCRUZ, que emprega a metodologia de Sanger automatizada para a execução do sequenciamento, através do sequenciador 3730 DNA *Analyser* do fabricante Applied Biosystems (Califórnia, Estados Unidos).

As sequências dos alelos obtidas foram analisadas utilizando o *software* Bioedit, que posteriormente foram comparadas com sequências contidas no banco de dados do Instituto Pasteur para a determinação dos STs.

2.6 Análise de perfil de agrupamentos obtidos por espectrometria de massa (MALDI-TOF)

2.6.1 <u>Extração total das cepas para perfil de agrupamentos obtidos por espectrometria de</u> <u>massa (MALDI-TOF)</u>

As amostras foram processadas a partir do método de extração total com ácido fórmico, seguindo protocolo de preparação de amostras, recomendado pelo fabricante (Bruker Daltonics). A suspensão bacteriana foi preparada colocando-se de duas a três colônias da bactéria, transferidas de uma placa de ágar nutriente para um microtubo de 1,5 mL contendo 300 µL de água MILLI-Q® (2021 Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Essa suspensão foi homogeneizada no vórtex por 15 segundos. Em seguida, foi adicionado 900 µL de etanol, homogeneizado no vórtex por 15 segundos e centrifugado a 13.000 r.p.m por 2 minutos. Após isso, o sobrenadante foi removido.

O *pellet* formado ficou secando à temperatura ambiente e depois foi ressuspendido em 50 μ L de ácido fórmico 70% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Após essa etapa, a suspensão foi homogeneizada por 15 segundos no vórtex, e na sequência, foram adicionados 50 μ L de acetonitrila 100% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). A mistura foi homogeneizada por 15 segundos no vórtex e após a centrifugação de 13.000 r.p.m por 2 minutos, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo microtubo de 1,5 mL.

Posteriormente, foi depositado 1 μ L do sobrenadante, obtido da extração anterior, na *target plate* MSP 96 (Bruker Daltonics) e deixado para secagem em temperatura ambiente. Em seguida, foi coberto com 1 μ L de matriz HCCA, deixando para secagem a temperatura ambiente para cristalização. Prontamente, a *target plate* MSP 96 com amostras preparadas, foi inserida

no aparelho MALDI-TOF MS Bruker Microflex LT/SH (Bruker Daltonik GmbH & Co. KG, alemanha).

2.6.2 <u>Obtenção e análise dos espectros para perfil de agrupamentos obtidos por espectrometria de massa (MALDI-TOF)</u>

Os espectros de massa foram adquiridos em um espectrômetro de massa MALDI-TOF MS Bruker Microflex LT/SH (Bruker Daltonik GmbH & Co. KG, Alemanha) usando os parâmetros padrão, descrito anteriormente no item 2.2.1.1.

Para cada cepa um total de 24 espectros brutos foram adquiridos a partir de 8 *spots* independentes, obtidos de três espectros por ponto, realizados em um único dia (replicadas técnicas), que foram mantidos no *software* MALDI BioTyper 3.0 (Bruker Daltonik). Estes espectros foram processados previamente aplicando os procedimentos de "suavização" e "subtração de linha de base" disponíveis no *software* FlexAnalysis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para gerar o espectro médio, posteriormente exportados como listas de picos com valores m/z e intensidades de sinal para cada pico em formato de texto.

2.6.3 Construção do dendrograma utilizando MALDI-TOF

Os espectros de massa MALDI TOF em formato de texto foram importados para um banco de dados dedicado do *software* BioNumerics v7.6 (Applied Maths, Ghent, Bélgica), onde foram pré processados e normalizados. Posteriormente, foi gerado um dendrograma considerando a homologia entre as amostras determinada pelo coeficiente de Dice em conjunto com método UPGMA. A análise de *cluster* foi feita aplicando o ponto de corte \geq 65%. (POT *et* al., 2017)

3. RESULTADOS

3.1 Cepas selecionadas para estudo

No ano de 2021. foram recebidas um total de 1.645 cepas de *K*. pneumoniae provenientes de materiais clínicos diversos pelo LabSUR. Destas cepas, 1.209 (73,49%) eram positivas para o gene bla_{KPC} . Baseado nessas informações, para este estudo foram selecionados 122 isolados (10,09%) de diferentes estados e de acordo com a demanda recebida pela rotina do laboratório, cuja identificação bacteriana foi confirmada através de MALDI-TOF, com identificação de alta confiança (escore acima de 2.00) e submetidas a confirmação do gene de carbapenemase *bla*_{KPC} através de PCR convencional.

As 122 cepas selecionadas pertenciam a diversos estados brasileiros, conforme pode ser observado na figura 4.



Figura 4. Frequência das 122 cepas de K. pneumoniae de acordo com estados brasileiros

Legenda: AM = Amazonas, BA= Bahia, CE = Ceará, ES= Espírito Santo, GO = Goiás, MG = Minas Gerais, RJ= Rio de Janeiro, RO = Rondônia e TO= Tocantins. Fonte: A autora, 2024.

Em relação aos diversos materiais clínicos originários das 122 amostras deste estudo, a maior prevalência foi para hemocultura (37,70%), seguido de urina (20,49%) e aspirado traqueal (13,93%), conforme tabela 5.

SÍTIO	QUANTIDADE (n)	PERCENTUAL (%)
Hemocultura	46	37,7%
Urina	25	20,5%
Aspirado traqueal	17	13,9%
Swab retal	9	7,4%
Cateter /ponta de cateter	8	6,6%
Fragmentos	8	6,6%
Líquidos	5	4,1%
Swab de pele	3	2,5%
Swab nasal	1	0,8%

Tabela 5. Distribuição das 122 cepas de K. pneumoniae de acordo com material clínico

Fonte: A autora, 2023.

3.2 Determinação da diversidade genética

3.2.1 Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico através de PFGE

A investigação dos perfis de fragmentação através de PFGE das 122 cepas de *K.pneumoniae* foi feita por meio da digestão com a enzima de restrição *Xba*I.

Através do dendrograma gerado pelo programa Bionumerics, foram obtidos 44 grupos clonais distintos, determinados de acordo com 85% de similaridade. Os grupos clonais foram nomeados "PF1" ao "PF44", como pode ser observado na figura 5.



Legenda: primeira coluna: número da amostra; segunda coluna: gene de resistência; terceira coluna; UF e quarta coluna; grupo clonal obtido por PFGE.



Figura 5. Dendrograma dos perfis de fragmentação do DNA obtidos através da técnica de PFGE das 122 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC (continuação)

Legenda: primeira coluna: número da amostra; segunda coluna: gene de resistência; terceira coluna; UF e quarta coluna; grupo clonal obtido por PFGE.





Legenda: primeira coluna: número da amostra; segunda coluna: gene de resistência; terceira coluna; UF e quarta coluna; grupo clonal obtido por PFGE.

O grupo clonal mais frequente foi o PF10 (n= 32, 26,2%), presente em 5 estados brasileiros (Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rondônia) pertencentes a 3 regiões do país: Sudeste, Norte e Nordeste. O grupo clonal PF9 foi o segundo mais frequentemente encontrado (n= 11, 9,0%). Relevante destacar que o grupo clonal PF9 foi encontrado em isolados oriundos apenas da região sudeste (Rio de Janeiro e Minas Gerais). Os outros grupos clonais foram encontrados em 6 ou menos amostras.

Grupo clonal	AM	BA	CE	ES	GO	MG	RJ	RO	то	Total
PF1	<u>.</u>								2	2
PF2						1				1
PF3		2								2
PF4						1				1
PF5							2	3		5
PF6	2			1						3
PF7						1				1
PF8					3					3
PF9						2	9			11
PF10			1	22		2	6	1		32
PF11					1					1
PF12						1				1
PF13				2						2
PF14							1			1
PF15						1				1
PF16				4				1		5
PF17				1			2			3
PF18				1						1
PF19						1				1
PF20		1		4						5
PF21						2				2
PF22						1				1
PF23						2		2		4
PF24						3				3
PF25	1							1		2
PF26					1					1
PF27								1		1
PF28				1		1				2
PF29				1		1				2
PF30						1				1
PF31		1								1
PF32				1						1
PF33				1						1
PF34					4					4
PF35				1		1				2
PF36				1						1
PF37									1	1
PF38						3				3
PF39						1				1
PF40							1			1
PF41							1			1
PF42							2			2
PF43	1									1
PF44							1			1

Tabela 6. Grupos clonais estabelecidos por PFGE das 122 cepas de K. pneumoniae produtorasde KPC oriundas de nove estados brasileiros (continua)

Fonte: A autora, 2024

Para determinação do ST, foi selecionada uma amostra de cada grupo clonal determinado pelo PFGE (n=44).

Não foi possível determinar o ST de 16 amostras, por dificuldades de conseguir sequenciamentos de qualidade para um ou mais genes. Para aqueles que ficaram faltando apenas um gene (n=5), a classificação foi realizada em relação ao Complexo clonal (STs com diferença em apenas um gene). Dessa forma, foi possível classificar em ST ou Complexo Clonal (CC) amostras pertencentes a 33 grupos clonais pelo PFGE (Tabela 7).

Perfil do	Variante Alélica							ST	CC
PFGE	gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB	-	
PF1	3	3	1	1	1	1		ND	11
PF2	3	4	6		7	4		ND	-
PF3								ND	-
PF4	3	4	6	1	7	4	38	147	147
PF5	1	1	1	1	1	1	1	15	15
PF6		3	1	1	1	1		ND	-
PF7	3	3	1	1	1		4	ND	11
PF8	4	1		1	1	1	4	ND	-
PF9	3	3	1	1	1	1	79	258	11
PF10	3	3	1	1	1	1	79	258	11
PF11	3	3	1	1	1	1	18	340	11
PF12	3		1	1	1	1	4	ND	11
PF13	3	3	1	1	1	1	4	11	11
PF14	2	3	2	1	1	4	56	152	-
PF15	3	3	1	1	1	1	4	11	11
PF16	4	1	2	52	1	1	7	307	-
PF17	3	1	1	1	1	1		ND	11
PF18	3		1	1	1	1		ND	-
PF19	3	3	1	1	1	1	4	11	11

Tabela 7. Distribuição da diversidade genética por meio de MLST para isolados de K.pneumoniae (continua)

PF20	3	3	1	1	1	1	4	11	11
PF21	3	3	1	1	1	1	4	11	11
PF22	3	3	1	1	1	1	4	11	11
PF23								ND	-
PF24	2	1	2	1	4	4	4	16	16
PF25	3	3	1	52	1			ND	-
PF26	2	5	2	2	7	1		ND	-
PF27	3	3	1	1	1	1	4	11	11
PF28	3	3	1	1	1	1	4	11	11
PF29	2	6	1	5	4	1	6	101	-
PF30	3	3	1	1	1	1	4	11	11
PF31	3	4	6	1	7	4	4	273	147
PF32	4	1	1	1	7	1	22	874	-
PF33	3	3	1	1	1	1		ND	11
PF34	2	5	2	2	7	1	10	48	-
PF35	4	1	1	1	7	1	22	874	-
PF36	3	3	1	1	1	1	4	11	11
PF37	1	1	1	1	1	1	4	709	15
PF38	2	1	1	1	7	1	4	1128	-
PF39	2	1	2	1	4	4	4	16	16
PF40	3		1	1	1			ND	-
PF41	18	22	18	16	25		165	ND	-
PF42		1	1	1		1		ND	-
PF43	18	22	74	64	154	20	99	1887	-
PF44	104	19	149	39	207	97	276	1647	-

Legenda: PF= Pulsed field, ST= Sequence Type, ND= Não determinado, CC= Complexo Clonal.Fonte: A autora, 2023.

Foram identificados 16 STs diferentes, onde o ST mais prevalente foi o ST11, encontrado em amostras representativas de 10 grupos clonais determinados pelo PFGE (Tabela 7).

Outros STs pertencentes ao CC11 (ST340 e ST258) foram encontrados em 3 grupos clonais, sendo que o ST258 foi identificado nas amostras pertencentes aos grupos clonais mais frequentes (PF9 e PF10, totalizando 43 amostras – 35,2%) (Tabela 6 e 7).

Incluindo as amostras que foram definidas apenas o CC (pois não foi possível sequenciar apenas um gene), pode-se observar que o CC11 foi detectado em amostras de 18 grupos clonais obtidos pelo PFGE, representando 54,5% (18/33) das amostras submetidas ao MLST em que foi definido o ST ou o CC. Levando em consideração todas as amostras de cada um dos grupos clonais obtidos pelo PFGE que foram pertencentes ao CC11, é possível observar que 69 amostras (56,6%) pertenciam a este CC e foram detectadas em todos os estados brasileiros incluídos no estudo, com exceção do Amazonas (Tabela 7).

De acordo com banco de dados do Instituto Pasteur, disponível em https://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella/, existem 6.759 STs depositados, até o presente momento.

A análise filogenética dos STs encontrados neste estudo foi realizada com o auxílio do *software* PHYLOViZ (https://online.phyloviz.net/), utilizando o algoritmo goeBURST v.1.2.1 (FRANCISCO *et al.*, 2009; FEIL *et al.*, 2004), onde foram detectados STs pertencentes a um mesmo complexo clonal como pode ser observado na Figura 6. Considerando como pertencente a um mesmo complexo clonal (CC) os STs com variações em apenas um locus gênico, foram identificados STs pertencentes ao CC11 (ST11, ST258 e ST340), CC709 -15 (STs 709 e 15) e CC147 (ST147 e 273) (Figura 6).

Figura 6. *Full Minimum Spanning Tree* (Full-MST) contendo os STs identificados no presente estudo, obtida através do *software* PHYLOViZ online



Legenda: Números arábicos em preto = STs; Números arábicos em vermelho = número de variação de *locus* Fonte: A autora, 2023.

3.3 Perfil de agrupamento obtido por espectrometria de massa

Com o objetivo de avaliar a utilidade do MALDI-TOF para a tipagem molecular, foi realizado o agrupamento dos espectros de massa obtidos das 122 cepas do estudo (figura 7) e posteriormente comparados os resultados obtidos com o PFGE e MLST (Tabela 8). Para facilitar a interpretação, os resultados foram subdivididos em 31 *clusters* baseados nos padrões de similaridade de 65%, apresentados no dendrograma, gerado a partir dos espectros de massa pelo MALDI-TOF.



Figura 7. Dendrograma e análise de clusters obtidos a partir dos espectros de massa gerados através de MALDI-TOF das 122 amostras de *K.pneumoniae* (continua)

Legenda: primeira coluna: número da amostra; segunda coluna: grupo clonal obtido por PFGE; terceira coluna: ST obtido através de MLST e quarta coluna: Classificação de clusters obtidos por MALDI-TOF.

Figura 7. Dendrograma e análise de clusters obtidos a partir dos espectros de massa gerados através de MALDI-TOF das 122 amostras de *K.pneumoniae* (conclusão)



Legenda: primeira coluna: número da amostra; segunda coluna: grupo clonal obtido por PFGE; terceira coluna: ST obtido através de MLST e quarta coluna: Classificação de clusters obtidos por MALDI-TOF.

			()	
Cluster MT (n)	PF	ST	CC	UF
	PF17		11	RJ
	PF13	11	11	ES
1 (n=6)	PF33		11	ES
x (m=0)	PF10	258	11	ES
	PF8			GO
	PF26			GO
2 (n=1)	PF4	147	147	MG
	PF17		11	ES
3 (n=4)	PF28	11	11	MG
	PF22	11	11	MG
	PF10	258	11	ES
	PF20	11	11	ES
4 (n=4)	PF10 (n=2)	258	11	MG/CE
	PF36	11	11	ES
5 (n=2)	PF31	273	147	BA
	PF10	258	11	ES
6 (n=2)	PF24	16	16	MG
	PF39	16	16	MG
	PF5	15	15	RO
7 (n=6)	PF40			RJ
	PF42			RJ
	PF5 (n=3)	15	15	RO (n=1)/RJ (n=2)
8 (n=1)	PF25			RO
9 (n=2)	PF2			MG
	PF38	1128		MG
10 (n=1)	PF27	11	11	RO
	PF10	258	11	ES
11 (n=3)	PF18			ES
	PF20	11	11	ES
	PF14	152		RJ
	PF29	101		ES
12 (n=5)	PF23			RO
	PF37	709	15	ТО
	PF38	1128		MG
	PF23			RO
	PF6			FS
13 (n=4)	DE25			
	1143			TO
	PF1		11	

Tabela 8. Distribuição dos *clusters* obtidos a partir dos espectros de massa gerados através de

MALDI-TOF (continua)

Cluster MT	PF	ST	CC	UF	
	PF35	874		MG	
14 (n=4)	PF16	307		RO	
	PF23 (n=2)			MG/MG	
15 (n=2)	PF9 (n=2)	258	11	RJ/RJ	
	PF11	340	11	GO	
	PF19	11	11	MG	
	PF10 (n=2)	258	11	ES/ES	
16 (n-11)	PF13	11	11	ES	
10 (II=11)	PF9 (n=2)	258	11	RJ/RJ	
	PF20	11	11	ES	
	PF8			GO	
	PF16 (n=2)	307		ES/ES	
17 ()	PF29	101		MG	
17 (n=2)	PF3			BA	
18 (n=1)	PF9	258	11	MG	
· · · · ·	PF15	11	11	MG	
	PF10 (n=15)	258	11	MG/ES (n=9)/RJ (n=5)	
	PF9 (n=4)	258	11	RJ (n=3)/MG	
	PF7		11	MG	
	PF12		11	MG	
	PF20 (n=2)	11	11	ES/BA	
	PF28	11	11	ES	
	PF1		11	ТО	
	PF21 (n=2)	11	11	MG/MG	
19 (n=40)	PF30	11	11	MG	
()	PF35	874		ES	
	PF32	8/4		ES	
	PF6 (n=2)			AM/AM	
	PF10	307		ES	
	PF42			RJ DO	
	PFS	15	15	RO	
	PF8 DE29			GO	
	PF38 DE2	1128			
	ГГЭ DF24			DA CO	
20 (n-2)	$\Gamma \Gamma \mathcal{I} \mathcal{I} \mathcal{I}$	40			
40 (II-4) 21 (2)	PF10(n=2)	258	11	ES/ES	
21 (n=2)	PF10 (n=2)	258	11	ES/ES	

Tabela 8. Distribuição dos *clusters* obtidos a partir dos espectros de massa gerados através de MALDI-TOF (continuação)

Cluster MT	PF	ST	CC	UF
	PF10	258	11	ES
	PF34	48		GO
22 (n=4)	PF34	48		GO
	PF34	48		GO
23 (n=1)	PF10	258	11	RJ
24 (n=1)	PF10	258	11	ES
25(n-2)	PF10	258	258	RO
25 (II=2)	PF43	1887		AM
26 (n =1)	PF41			RO
27 (n=1)	PF44	1647		RJ
28 (n =1)	PF17		11	RJ
29 (n=1)	PF9	258	11	RJ
30(n-3)	PF24 (n=2)	16	16	MG/MG
50 (II-5)	PF9	258	11	RJ
31 (n-?)	PF16	307		ES
31 (II-2)	PF10	258	258	ES

Tabela 8. Distribuição dos *clusters* obtidos a partir dos espectros de massa gerados através de MALDI-TOF (conclusão)

Fonte: A autora, 2023.

Dos 31 *clusters* obtidos pelo MALDI-TOF (representados na figura 7 e na tabela 8), o *cluster* 19 agrupou o maior número de isolados (n= 40), dentre os isolados estavam os grupos clonais mais prevalentes obtidos pelo PFGE, PF10 (15/40) e PF9 (4/40), os outros grupos clonais apresentaram 2 ou menos isolados. Com relação ao CC11, O *cluster* 19 apresentou 29/40 isolados, representando 72,5% neste *cluster*.

O *cluster* 16 foi o segundo com mais isolados agrupados (n=11), onde PF9, PF10, PF16 tinham dois representantes cada e PF8, PF11, PF13, PF19, PF20, tinham um representante de cada. Oito de onze isolados do *cluster* 16, pertenciam ao CC11, representando 72,7% deste *cluster*.

No cluster 1 foram agrupadas seis cepas pertencentes a seis grupos clonais distintos.

No *cluster* 7 foram agrupadas seis cepas pertencentes a três grupos clonais diferentes: PF5, PF40 e PF42. Cabe ressaltar que quatro das cinco cepas que pertencem ao PF5 (ST15) foram agrupadas no *cluster* 7. Neste *cluster*, havia apenas amostras dos estados do Rio de Janeiro e Rondônia. No *cluster* de número 12, foram agrupadas cinco cepas, das quais cada uma pertencia a um grupo clonal diferente pelo PFGE e a um ST distinto obtido pelo MLST: PF14(ST152), PF29(ST101), PF37(ST709) e PF23, PF38 não tinham ST determinado.

Os *clusters* restantes apresentaram quatro ou menos isolados por agrupamento. Destacando o *cluster* 22 onde três dos quatro isolados pertenciam ao PF34 (ST48).

4 DISCUSSÃO

K. pneumoniae é um patógeno oportunista que está frequentemente associado às infecções adquiridas no ambiente hospitalar e às infecções adquiridas na comunidade. Está entre as bactérias que representam uma das maiores ameaças à saúde do ser humano, além de pertencer à lista de microrganismos de prioridades críticas da OMS (2017), que visa orientar e incentivar o desenvolvimento de novos antimicrobianos para o tratamento de bactérias resistentes aos antibióticos (TACCONELLI *et al.*, 2018).

Dados do programa de vigilância antimicrobiana SENTRY, publicado em 2019, demonstraram o grande desafio terapêutico dos patógenos bacterianos mais comuns encontrados em infecções de corrente sanguínea. Nesse estudo, foram analisados 264.901 isolados clínicos provenientes de pacientes com infecções de corrente sanguínea, em um período de 1997 a 2016, em 200 centros médicos distribuídos por 45 países. Além do aumento da prevalência de Enterobacteriaceae MDR (*Multidrug-Resistant*) ao longo dos anos, que passou de 6,2% (1997 a 2000) para 15,8% (2013 a 2016), o estudo mostrou que *K. pneumoniae* correspondia a 7,7% dos isolados clínicos (DIEKEMA *et al.*, 2019).

No ano de 2022, de acordo com dados da Rede de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana da ANVISA, nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais, *K. pneumoniae* foi o bacilo Gram-negativo mais isolado em infecções primárias de corrente sanguínea laboratorialmente confirmadas (IPCSL) em UTI para adultos. Esses dados são de extrema relevância, pois ressaltam a crescente preocupação com a disseminação desse patógeno oportunista resistente aos antimicrobianos (ANVISA, 2022).

Os carbapenêmicos são frequentemente utilizados no tratamento de infecções por bacilos Gram-negativos multirresistentes. Enterobactérias, principalmente *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases, em ambientes de saúde, são extremamente preocupantes devido ao seu fenótipo de resistência a múltiplas drogas. A produção de KPC (carbapenamase mais disseminada no mundo atualmente) se tornou uma grande ameaça à saúde pública desde a sua primeira descrição no ano de 2001, particularmente devido à grande capacidade de disseminação através de elementos genéticos móveis, assim como através da disseminação global de clones de alto risco (ZHOU *et al.*, 2020). No cenário brasileiro, a enzima KPC também permanece como a carbapenemase mais prevalente e é frequentemente associada à resistência aos carbapenêmicos (KIFFER *et al.*, 2023).

A tipagem molecular dos clones circulantes que carreiam o gene $bla_{\rm KPC}$ é fundamental para a investigação de surtos hospitalares assim como para a vigilância epidemiológica. O PFGE tem sido considerado o padrão ouro para esta abordagem, sendo uma ferramenta importante para investigação de surtos de curta duração, vigilância e estudos filogenéticos. *K. pneumoniae* desempenha um papel crucial como um dos patógenos mais significativos em surtos hospitalares globais, sendo assim análises epidemiológicas são úteis para determinar a extensão de um surto e esclarecer as fontes de disseminação das infecções (NEOH *et al.*, 2019; BERRAZEG *et al.*, 2013).

Deste modo, para este estudo foram selecionadas 122 isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC, oriundas de diferentes estados brasileiros no ano de 2021 com intuito de observar e comparar as principais diferenças e semelhanças entre cepas utilizando as técnicas de PFGE e MLST, além de avaliar o uso da ferramenta MALDI-TOF-MS como uma ferramenta de tipagem bacteriana mais barata e mais rápida.

Utilizando a técnica de PFGE, foram identificados 44 grupos clonais diferentes, expressando uma população clonal amplamente diversificada. O grupo clonal mais frequente foi o PF10, encontrado em 26,2% dos isolados estudados, este grupo clonal foi constituído por cepas de diversas regiões: Sudeste (ES, MG e RJ), Norte (RO) e Nordeste (CE), revelando-se um grupo onde a disseminação de cepas resistentes ocorreu em diferentes regiões do Brasil.

O segundo mais frequentemente encontrado foi o grupo clonal PF9 (n= 11, 9,0%), porém diferente do PF10, os isolados eram oriundos apenas da região sudeste (Rio de Janeiro e Minas Gerais).

O estudo publicado por Pereira e colaboradores em 2013, do início da disseminação da KPC em nosso país (2010), foi realizado com 113 isolados recuperados de diferentes estados brasileiros, similarmente ao nosso estudo. Foi observado a presença de 22 grupos clonais, com a prevalência 3 grupos clonais, que foram nomeados pela autora como: A/Kp-RJ (28%), C (29%) e Q (13%), distribuídos pelas regiões sudeste (ES, RJ e MG), nordeste (CE, PI, AL), centro-oeste (GO e DF) e região sul (SC), demonstrando assim, a dispersão de cepas resistentes em diversas regiões do país, assim como em nosso estudo.

Outro estudo realizado na região sudeste do Brasil em 2023, também indicou uma alta variabilidade genética nas cepas de *K. pneumoniae* produtoras de *bla*_{KPC}, onde a tipagem molecular através da técnica PFGE resultou na identificação de 13 grupos clonais distintos, destacando três como mais frequentes: KpA (n = 16, 40%), KpB (n = 8, 20%), e KpC (n = 3, 7,5%), dentre as 40 cepas avaliadas, provenientes de ambientes hospitalares (BORGHI; MONALESSA; SHUENCK, 2023).

A disseminação global de cepas de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos representa uma preocupação crescente para a saúde pública devido a sua elevada resistência aos antimicrobianos e capacidade de causar infecções graves e até fatais. Apesar da considerável diversidade clonal evidenciada em amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases, principalmente $bla_{\rm KPC}$, ao redor do mundo, tem-se observado a presença e disseminação de clones de "alto risco" em diversas nações (DAVID *et al.*, 2019).

Os clones de alto risco normalmente compartilham um ancestral recente, de sucesso epidêmico. Esses clones são continuamente associados a surtos e muitas vezes disseminados em diferentes países. Eles provavelmente possuem características particulares que aumentam sua capacidade de persistência e transmissibilidade, proporcionando-lhes uma maior oportunidade para aquisição de genes de resistência a antibióticos e disseminação em diferentes ambientes. Dentre esses clones de alto risco, o CC11 de *K. pneumoniae* é um dos mais prevalentes e associado à disseminação de carbapenemases tipo KPC nessa espécie, tornandose um desafio clínico significativo (DAVID *et al.*, 2019; BOWERS *et al.*, 2015).

No presente trabalho, foram identificados 16STs diferentes, onde, três STs (ST11, ST258 e ST340) fazem parte do complexo clonal 11 (CC11). Considerando que todas as amostras de um mesmo grupo clonal de PFGE como pertencentes a um mesmo ST e incluindo aquelas amostras que ficaram faltando apenas um gene sequenciado para a definição do ST, pudemos observar que 56,6% das amostras incluídas no estudo pertenciam ao CC11, dispersas em 8 dos 9 estados brasileiros estudados (MG, ES, RJ, GO, RO, BA, CE e TO), corroborando com o estudo de Pereira e colaboradores (2013) realizado com 133 amostras isoladas em 2010, onde observaram 22 STs distintos, sendo 75% de seus isolados classificados como pertencentes ao CC11, em diferentes estados brasileiros (ST11 em CE, DF, GO, MG, PE, RJ e ST340 em AL, DF, ES, PI), evidenciando que este complexo clonal ainda é muito importante na disseminação de KPC no Brasil.

Estudos mais recentes têm mostrado a presença do ST11 mais frequentemente entre as amostras brasileiras. Silveira e colaboradores (2021) fizeram o sequenciamento completo do genoma de BGNs, em isolados de infecção de corrente sanguínea, com intuito de observar a distribuição clonal e a diversidade destes microrganismos. A maioria dos isolados pertencia ao ST11 (n = 16) seguido do ST258, (n = 4). Relatando a presença do complexo clonal de alto risco, CC11, como mais prevalente (45,7%).

O ST mais prevalente carreando KPC-2 no Brasil desde 2010 até os dias de hoje ainda é o ST11, conforme observado no nosso estudo realizado com amostras isoladas em 2021, onde encontramos ST11 (n=10) como o mais prevalente, seguido dos ST258 (n=2) e ST340 (n=1) que pertencem ao CC11.

Na China, foram coletados 354 isolados de *K*, *pneumoniae* de quatro hospitais, sendo que 193 cepas foram identificadas como portadoras de bla_{KPC-2} , enquanto 161 cepas foram negativas para esse gene. Houve uma diferença significativa na distribuição dos STs entre as cepas produtoras e não produtoras de KPC. No grupo positivo para bla_{KPC-2} , o ST11 foi o mais frequentemente encontrado, representando 87,1% (168/193) dos isolados, já nos negativos para KPC tiveram apenas 3,1% de amostras pertencentes ao ST11 (5/161) (Fu *et al.*, 2019).

O estudo de Gu e colaboradores (2018) investigou um surto fatal de pneumonia associada à ventilação mecânica em UTI, onde todas as cinco cepas representativas de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos pertenciam ao ST11, e foram originados do mesmo clone. Nos últimos anos, o ST11 tem sido considerado o clone mais transmissível, contribuindo para o aumento da prevalência de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos na China. Cepas de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos pertencentes ao ST11 já foram identificadas em diversos países, incluindo Coreia do Sul, Japão, Cingapura, Taiwan, Tailândia, Alemanha, Espanha, Grécia, Hungria, Itália, Reino Unido, Curaçao, Argélia, Polônia, Emirados Árabes Unidos, Brasil, Áustria, França, Índia, Argentina, Israel, EUA e Venezuela. Dessa forma, esse ST se configura como um clone de alto risco com ampla distribuição internacional (LIAO *et al.*, 2020).

Faccone e colaboradores (2023) apontaram que a disseminação de KPC na Argentina, foi principalmente impulsionada pelo ST258 e, mais recentemente, por outros clones menores, como ST25 e ST307.

No Uruguai, o primeiro relato de isolado de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2, também pertencente ao ST258 em 2011, estava associada a um surto de *K. pneumoniae* em um hospital geral (MARQUEZ, et al 2014).

Diferente do descrito na Argentina por Faccone e colaboradores (2023), o estudo realizado por Pereira e colaboradores (2013) com amostras isoladas em 2010 no Brasil não mostrou a presença do ST258. Apesar do CC11 ser o mais prevalente entre as amostras produtoras de KPC-2, este ST era raramente encontrado no Brasil no início da disseminação da KPC. Apenas um estudo publicado em 2011 mostrou a presença do ST258 em amostras associadas a um surto nosocomial na cidade de Ribeirão Preto (ANDRADE *et al.*,2011).

Ao longo dos anos, o aumento progressivo de microrganismos multirresistentes vem se transformando em uma pandemia silenciosa. Nesse contexto, é de extrema relevância promover

a criação de testes que possibilitem a detecção rápida e confiável de resistência antimicrobiana, bem como a identificação de surtos.

A técnica de PFGE, apesar de ser bastante confiável para a avaliação de surtos, é demorada e bastante laboriosa. A técnica de MLST também não é a melhor opção para a avaliação de surtos, pois necessita de uma etapa de PCR e sequenciamento dos produtos gerados e principalmente por ser uma metodologia que avalia a origem filogenética das amostras bacterianas e analisar genes conservados dentro da espécie.

O sequenciamento do genoma total é uma metodologia que pode ser usada para a análise da diversidade genética entre as cepas de uma mesma espécie através das análises do polimorfismo de nucleotídeos. Apesar da redução significativa no custo desta técnica nos últimos anos, ela ainda é muito cara no Brasil e não é rotineiramente utilizada em laboratórios clínicos.

A aplicação da ferramenta MALDI-TOF revolucionou o processo de identificação de microrganismos nas áreas de microbiologia clínica, ambiental e de alimentos. Devido à exigência de apenas uma preparação amostral simples e à capacidade de obtenção de resultados em um intervalo de tempo reduzido. Assim, a ferramenta MALDI-TOF tem sido cada vez mais utilizada em laboratórios de microbiologia clínica.

Assim, alguns estudos têm sugerido a utilização dessa metodologia como uma alternativa viável a realização de tipagem bacteriana. Entretanto, o uso desta metodologia para agrupamento bacteriano é um desenvolvimento recente e sua eficácia e aplicabilidade têm gerado controvérsias na comunidade científica (FANG *et al.*, 2020).

Alguns pesquisadores destacaram que a espectrometria de massa MALDI-TOF pode ser utilizada como um método rápido e eficaz de tipagem para patógenos nosocomiais, tais como: *Enterobacter cloacae* produtores de ESBL, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Acinetobacter baumannii, Serratia marcescens* e *Citrobacter freundii* (MENCACCI et al., 2013; KHENNOUCHI et al., 2015; STEENSELS et al., 2017; RÖDEL et al., 2019).

Rödel e colaboradores (2019) avaliaram o uso de MALDI-TOF para discriminar *clusters* relacionados a surtos hospitalares em isolados de *Serratia marcescens* e *Citrobacter freundii* produtores de carbapenemases. A análise de agrupamento por MALDI-TOF foi largamente concordante com os resultados da genotipagem para *S. marcescens*, quando o limite de similaridade para identidade clonal foi definido em 90%. O WGS confirmou os resultados da MALDI-TOF, pois os isolados de um mesmo tipo de WGS foram agrupados no mesmo *cluster* de MALDI-TOF.

Em um estudo realizado recentemente com objetivo de investigar a epidemiologia molecular de cepas de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, Fang e colaboradores (2020) observaram, após análises estatísticas, que o sistema PFGE e o sistema MALDI-TOF MS forneceram resultados semelhantes, com uma boa concordância entre os dois métodos. Os autores concluíram que o MALDI-TOF MS pode ser considerado uma provável alternativa na "clusterização" de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 quando comparado ao PFGE. No entanto, devido ao pequeno tamanho amostral, seriam necessários estudos adicionais para confirmar os resultados.

Em nosso estudo, pudemos observar que a espectrometria de massas é capaz de gerar um dendrograma e agrupar os isolados em *clusters*, entretanto, isolados que tiveram grupos clonais idênticos quando utilizamos o PFGE foram agrupados em diferentes *clusters* gerados pelo MALDI-TOF MS. Por exemplo, quando comparamos o PF10, que é o grupo clonal com maior quantidade de isolados agrupados pelo PFGE, com a espectrometria de massas, os isolados ficaram dispersos entre diversos *clusters*, demonstrando uma baixa correlação entre as técnicas aplicadas.

Isso também foi relatado por outros autores, como por exemplo Jiang e colaboradores (2019) que observaram uma notável concordância entre os resultados da tipagem por PFGE e MLST, realizada em 44 isolados de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases. No entanto, os pesquisadores constataram uma baixa congruência entre o MALDI-TOF MS e a tipagem por PFGE. Eles sugeriram que alcançar um nível equivalente de discriminação de linhagens utilizando o MALDI-TOF MS pode ser desafiador em comparação com o método de referência PFGE (JIANG *et al.*, 2019).

Conforme documentado na literatura, a maioria das proteínas e/ou peptídeos identificados nos espectros de massa exibem uma massa molecular (<12.000 Da), sendo aproximadamente metade dos picos associados às proteínas ribossômicas. As sequências de aminoácidos das proteínas ribossômicas geralmente apresentem alta conservação dentro da mesma espécie (RYZHOV&FENSELAU, 2001;SINGHAL et al., 2015). O estudo de Rodrigues e colaboradores (2017) sugeriu um grau de conservação de proteínas ribossômicas dentro de *K. pneumoniae* (99-100% para as 56 proteínas reconhecidas até o momento).

Como a maioria dos espectros de MALDI-TOF MS é composta por proteínas altamente conservadas, com funções essenciais que são minimamente afetadas pelas condições ambientais e, portanto, são consideradas ótimas para a tipagem proteômica de bactérias, o que é consideravelmente diferente da tipagem genética (BERRAZEG et al., 2013).

Bowers e Colaboradores (2015) pesquisaram as relações filogenéticas e a evolução dentro do CC11. Nesse estudo, foram analisadas as sequências genômicas de 167 isolados de 20 países coletados durante 17 anos, onde foi possível observar que o ST258 permaneceu altamente clonal ao longo dos anos, e após a caracterização das proteínas de membrana externa, as sequências revelaram que o perfil do ST258 incluiu uma OmpK35 truncada, sugerindo possíveis marcadores genéticos exclusivos para ST258. Apesar dessa OmpK35 truncada não ser uma exclusividade do ST258, como foi observado no estudo, apenas nove isolados que não pertenciam ao ST258 apresentam esse perfil.

Dessa forma, seria possível que estas características fenotípicas do ST258 pudessem ser utilizadas para identificar esse ST ou mesmo o complexo clonal 11 através da técnica de MALDI-TOF. Contudo, em nosso estudo, através da análise realizada com os espectros de massa gerados, não foi possível observar uma correlação consistente entre os ST, ou mesmo amostras de um mesmo complexo clonal, e os *clusters* gerados na análise do MALDI-TOF, observamos amostras pertencentes ao CC11 em 21 dos 31 *clusters* de MALDI-TOF encontrados.

Berrazeg e colaboradores (2013), apesar de terem obtido resultados promissores utilizando a ferramenta MALDI-TOF, encontrando *clusters* específicos que estavam expressivamente associados a fenótipos de diferentes fontes clínicas, geográficas e estações do ano, ao comparar os *clusters* obtidos do dendrograma do MALDI-TOF com a distribuição de seus STs notaram que não houve correlação entre as duas técnicas, assim como em nosso estudo.

O equipamento de MALDI-TOF está presente no dia a dia dos laboratórios de microbiologia dos hospitais e o uso desta ferramenta de tipificação seria de grande valia, visto que ajudaria no acompanhamento de clones de alto risco e surtos, nos dando uma resposta rápida e barata. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos no nosso estudo, não foi possível ter uma correlação com as outras técnicas padrão ouro para a tipagem molecular de *K. pneumoniae* (PFGE e MLST), nem foi possível encontrar nenhuma correlação dos *clusters* obtidos no MALDI-TOF com a localização de isolamento ou qualquer outra característica. Entretanto, é importante ressaltar que a nossa amostragem foi de estados diferentes, isoladas em 2021, ou seja, eram amostras que não possuíam necessariamente relação epidemiológica. Dessa forma, é possível que em uma situação de surto ou de maior relação epidemiológica entre as amostras, o MALDI-TOF se mostre útil para a avaliação da relação clonal entre as amostras.

5 CONCLUSÕES

A determinação da diversidade genética por PFGE dos 122 isolados de *K. pneumoniae* produtora de KPC oriundos de diferentes estados brasileiros revelou uma população clonal amplamente diversificada, assim como o encontrado por outros autores.

Com base nos resultados do MLST, evidenciamos que 56,6% das cepas incluídas no estudo pertenciam ao CC11, que é considerado clone de alto risco por estar associado à disseminação da carbapenemase KPC.

Foi possível observar que a espectrometria de massas é capaz de gerar um dendrograma e agrupar os isolados em *clusters*, porém, cepas que tiveram grupos clonais idênticos quando utilizamos o PFGE foram agrupados em diferentes *clusters* gerados pelo MALDI-TOF MS.

Através da análise realizada com os espectros de massa gerados pelo MALDI-TOF, não foi possível obter uma correlação com as outras técnicas padrão ouro para a tipagem molecular de *K. pneumoniae* (PFGE e MLST) e nem encontrar nenhuma correlação dos *clusters* obtidos no MALDI-TOF com a localização de isolamento ou qualquer outra característica, sendo necessário, portanto, pesquisas posteriores.

REFERÊNCIAS

ADEOLU, M. *et al.* Genome-based phylogeny and taxonomy of the Enterobacteriales': proposal for Enterobacteriales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriac+A2:A147eae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 66, n. 12, p. 5575-5599, 2016.

AIRES, C. A. M. *et al.* Population structure of KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae isolated from surveillance rectal swabs in Brazil. **Microb Drug Resist,** v. 26, n. 6, p. 652-660, 2020.

ÁLVAREZ, V. E. *et al.* Genomic analysis of the first isolate of KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae from Uruguay. **J. Glob. Antimicrob. Resist**., v. 15, p. 109–110, 2018.

AMBLER, R. P. The structure of β-lactamases. **Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.**, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.

ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **J microbiol methods**, v. 138, p. 20-29, 2017.

ANHALT, J. P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 47, n. 2, p. 219-225, 1975.

ANVISA, Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 30, 2022. Disponível em:

<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiNzg4Mzg0NDctMDJiZS00ZWY0LTkyMzMtYW Q5YmQ4N2RhNDYyIiwidCI6ImI2N2FmMjNmLWMzZjMtNGQzNS04MGM3LWI3MDg1 ZjVIZGQ4MSJ9>. Acesso em : 28 de novembro 2022

ANVISA, Curso de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde – IRAS/ Modulo 1, 2004. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/iras/M%F3dulo%201%20-%20Legisla%E7%E30%20e%20Programa%20de%20Preven%E7%E30%20e%20Controle% 20de%20Infec%E7%E30%20Hospitalar.pdf. Acesso em: 12 de dezembro 2021

ANVISA, Informativo da Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar, Setembro 2020

Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-

<u>br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/boletim_informativo_cecih_r</u> <u>j_2020_dados_iras_2019.pdf</u>

ANWER, R. *et al.* MALDI-TOF MS for Rapid Analysis of Bacterial Pathogens Causing Urinary tract Infections in the Riyadh Region. **Diseases**, v. 10, n. 4, p. 78, 2022.

ASHURST, J.V.; DAWSON, A. Klebsiella Pneumonia. **In: StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/. Acesso em: 20 de novembro de 2023.

AZEVEDO, P. A. A. *et al.*, Molecular characterisation of multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae belonging to CC258 isolated from outpatients with urinary tract infection in Brazil. **J Glob Antimicrob Resist**, v.18, p. 74-79, 2019.

BARANIAK, A. *et al.* Multiregional dissemination of KPC-producing Klebsiella pneumoniae ST258/ST512 genotypes in Poland, 2010–14. J Antimicrob Chemother, v. 72, n. 6, p. 1610-1616, 2017.

BASSETTI, M.; PEGHIN, M. How to manage KPC infections. Ther Adv Infect Dis., v. 7, 2020.

BAUERNFEIND, A. *et al.* Spread of klebsiella pneumoniae producing SHV-5 beta-lactamase among hospitalized patients. **Infection**, v. 21, n. 1, p. 18-22, 1993.

BEDENIĆ, B. *et al.* Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) in urinary infection isolates. Arch microbiol, v. 203, p. 1825-1831, 2021.

BERRAZEG, M. *et al.* Biotyping of multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61428, 2013

BOGGS, S. R.; CAZARES, L. H.; DRAKE, R. Characterization of a Staphylococcus aureus USA300 protein signature using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **J med microbiol**, v. 61, n. 5, p. 640-644, 2012.

BORGHI, M.; PEREIRA, M. F.; SCHUENCK, R. P. The Presence of Virulent and Multidrug-Resistant Clones of Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae in Southeastern Brazil. **Curr Microbiol**, v. 80, n. 9, p. 286, 2023.

BOWERS, J. R. *et al.* Genomic Analysis of the Emergence and Rapid Global Dissemination of the Clonal Group 258 Klebsiella pneumoniae Pandemic. **PLoS ONE**, v. 10, n.7, p. e0133727, 2015.

BRADFORD, P. A. *et al.* Imipenem resistance in Klebsiella pneumoniae is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the foss of an outer membrane protein. **Antimicrob agents chemother**, v. 41, n. 3, p. 563-569, 1997.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. Clin microbiol rev., v. 33, n. 2, 2020.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β-lactamases. **Antimicrob** agents chemother., v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

CARBONNELLE, E. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clin biochem**, v. 44, n. 1, p. 104-109, 2011.

CARVALHO-ASSEF, A. P. *et al.* Isolation of NDM-producing Providencia rettgeri in Brazil. **J Antimicrob Chemother.**, v. 68, n. 12, p. 2956-2957, 2013.

CASTANHEIRA, M. *et al.* Variations in the occurrence of resistance phenotypes and carbapenemase genes among Enterobacteriaceae isolates in 20 years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Open forum infec dis.**, v.15, n.6, p.S23-S33, 2019.

CHEN, L. *et al.* Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae: molecular and genetic decoding. **Trends Microbiol**, v. 22, n. 12, p. 686-696, 2014.

CHERUVANKY, A. et al. Enhanced Klebsiella pneumoniae Carbapenemase Expression from a Novel Tn4401 Deletion. **Antimicrob Agents Chemother**, v.61, n.6, p. e00025-17, 2017.

CLARK, A. E. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clin **Microbiol Rev.**, v. 26, n. 3, p. 547-603, 2013.

CONCEIÇÃO-NETO, O. C. *et al.* Polymyxin resistance in clinical isolates of K. pneumoniae in Brazil: Update on molecular mechanisms, clonal dissemination and relationship with KPC-producing strains. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 12, p. 898125, 2022.

CONLAN, S.; KONG, H. H.; SEGRE, J. A. Species-level analysis of DNA sequence data from the NIH Human Microbiome Project. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47075, 2012.

CUZON, G. *et al.* Worldwide diversity of Klebsiella pneumoniae that produce β -lactamase blaKPC-2 gene. Emerg Infect Dis, v. 16, n. 9, p. 1349, 2010.

DA SILVA, R. M.; TRAEBERT, J.; GALATO, D. Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing Klebsiella pneumoniae: a review of epidemiological and clinical aspects. **Expert Opin Biol Ther**, v. 12, n. 6, p. 663-671, 2012.

DAVID, S. *et al.* Epidemic of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in Europe is driven by nosocomial spread. **Nat microbiol.**, v. 4, n. 11, p. 1919-1929, 2019.

DE SALES, R. O. *et al.* A Comprehensive Genomic Analysis of the Emergent Klebsiella pneumoniae ST16 Lineage: Virulence, Antimicrobial Resistance and a Comparison with the Clinically Relevant ST11 Strain. **Pathogens,** v. 11, n. 12, p. 1394, 2022.

DELEO, F. R. *et al.* Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 Klebsiella pneumoniae. **Proc Natl Acad Sci U S A., v.** 111, p. 4988–4993, 2014.

DIANCOURT, L. *et al.* Multilocus sequence typing of Klebsiella pneumoniae nosocomial isolates. **J clin microbiol.**, v. 43, n. 8, p. 4178-4182, 2005

DIEKEMA, D. J. *et al.* The microbiology of bloodstream infection: 20-year trends from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrob agents chemother.,** v. 63, n. 7, p. 355-419, 2019.

DING, L. *et al.* Comparison of Four Carbapenemase Detection Methods for bla KPC-2 Variants. **Microbiol Spectr.**, v. 9, n. 3, p. e00954-21, 2021.

DINKELACKER, A. G. *et al.* Typing and species identification of clinical Klebsiella isolates by Fourier transform infrared spectroscopy and matrix-assisted laser desorption ionization—time of flight mass spectrometry. **J clin microbiol**, v. 56, n. 11, p. 00843-18, 2018.

DIXON, P. *et al.* A systematic review of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-offlight mass spectrometry compared to routine microbiological methods for the time taken to identify microbial organisms from positive blood cultures. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 34, p. 863-876, 2015.

ESTABROOK, M. *et al.* Epidemiology of Resistance Determinants Identified in Meropenem-Nonsusceptible Enterobacterales Collected as Part of a Global Surveillance Study, 2018 to 2019. **Antimicrob agents and chemother**, v.67, n. 5, p. e0140622, 2023.

FACCONE, D. *et al.* Emergence of Hyper-Epidemic Clones of Enterobacterales Clinical Isolates Co-Producing KPC and Metallo-Beta-Lactamases during the COVID-19. **Pandemic. Pathogens**, v. 12, n. 3, p. 479, 2023

FANG, L. *et al.* Epidemiology and Risk Factors for Carbapenem-Resistant Klebsiella Pneumoniae and Subsequent MALDI-TOF MS as a Tool to Cluster KPC-2-Producing Klebsiella Pneumoniae, a Retrospective Study. **Front Cell Infect Microbiol.,** v. 10, n. September, p. 1–8, 2020.

FEIL, E. J. *et al.* eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **J bacteriol.**, v. 186, n. 5, p. 1518-1530, 2004.

FILGONA, J.; BANERJEE, T.; ANUPURBA, S. Role of efflux pumps inhibitor in decreasing antibiotic resistance of Klebsiella pneumoniae in a tertiary hospital in North India. **J Infect Dev Ctries**, v. 9, n. 08, p. 815-820, 2015.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. **Br J Exp Pathol.**, v. 10, n. 3, p. 226, 1929.

FRANCISCO, A. P. *et al.* Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. **BMC bioinformatics**, v. 10, p. 1-15, 2009.

FRIEDLAENDER, C. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. Archiv Patholog. **Anat. Physiol. Klinische Med**, v. 87, p. 319–324, 1882.

FU, P. *et al.* Pandemic spread of blaKPC-2 among Klebsiella pneumoniae ST11 in China is associated with horizontal transfer mediated by IncFII-like plasmids. **I J antimicrob agents**, v. 54, n. 2, p. 117-124, 2019.

FUH, M. M.; HEIKAUS, L.; SCHLÜTER, H. MALDI mass spectrometry in medical research and diagnostic routine laboratories. **Int J Mass Spectrom**, v. 416, p. 96-109, 2017.

GIANI, T. *et al.* Emergence in Italy of Klebsiella pneumoniae sequence type 258 producing KPC-3 carbapenemase. **J clin microbiol**, v. 47, n. 11, p. 3793, 2009.
GÓMEZ, S. A. *et al.* Clonal dissemination of Klebsiella pneumoniae ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 10, p. 1520-1524, 2011.

GRUNDMANN, H. *et al.* Occurrence of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 2, p. 153-163, 2017.

GU, D. *et al.* A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent Klebsiella pneumoniae in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. **Lancet Infect Dis**, v. 18, n. 1, p. 37-46, 2018.

HASHEMIZADEH, Z. *et al.* Dissemination pattern of multidrug resistant carbapenemase producing Klebsiella pneumoniae isolates using pulsed-field gel electrophoresis in southwestern Iran. **Infect Drug Resist**, p. 921-929, 2020

HEATLEY, N. G. Penicillin and Luck: Good Fortune in the Development of the miracle Drug'. **RCJT Books**, 2004

HOLT, K. E. *et al.* Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in Klebsiella pneumoniae, an urgent threat to public health. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 27, p. E3574-E3581, 2015.

HORNA, G. *et al.* Characterisation of the first KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae ST340 from Peru. **J. Glob. Antimicrob. Resist.**, v. 9, p. 36–40, 2017.

INDRAJITH, S. *et al.* Molecular insights of carbapenem resistance Klebsiella pneumoniae isolates with focus on multidrug resistance from clinical samples. **J Infect Public Health**, v. 14, p. 131–138, 2021.

JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. More extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob agents chemother, v. 35, n. 9, p. 1697-1704, 1991.

JIANG, F. *et al.* Overestimated discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae clones. **Epidemiol Infect**, v. 147, p. e324, 2019.

JIN, X. *et al.* Resistance evolution of hypervirulent carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae ST11 during treatment with tigecycline and polymyxin. **Emerg Microbes Infect**, v. 10, n. 1, p. 1129-1136, 2021.

JUMAA, P.; CHATTOPADHYAY, B. Pseudobacteraemia with multiply resistant Klebsiella pneumoniae resulting from contamination from the blood gas machine on a neonatal unit. **J Hosp Infect**, v. 22, n. 3, p. 251-255, 1992.

KACZMAREK, F. M. *et al.* High-level carbapenem resistance in a Klebsiella pneumoniae clinical isolate is due to the combination of bla ACT-1 β-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin PhoE. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 10, p. 3396-3406, 2006.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 Daltons. **Anal Chem**, v. 60, n. 20, p. 2299–301, 1988.

KARGER, A. *et al.* Determination of serotypes of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates by intact cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 3, p. 896-905, 2011.

KHENNOUCHI, N. C. *et al.* MALDI-TOF MS as a tool to detect a nosocomial outbreak of extended-spectrum- β -lactamase-and ArmA methyltransferase-producing Enterobacter cloacae clinical isolates in Algeria. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59, n. 10, p. 6477-6483, 2015

KIFFER, C. R. V. *et al.* Exploratory model for estimating occupation-day costs associated to Hospital Related Infections based on data from national prevalence project: IRAS Brasil Project. **J Infect Control**, v. 4, n. 1, p. 30-33, 2015.

KONEMAN, E. W. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.: Lippincott Williams Wilkins. Philadelphia, PA, 2006.

KUHNS, M. *et al.* Rapid discrimination of Salmonella enterica serovar Typhi from other serovars by MALDI-TOF mass spectrometry. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e40004, 2012.

LABIA, R. *et al.* The kinetics of SHV-2 plasmid-mediated beta-lactamase compared to those of the parent enzyme from which it is derived. **Drugs Exp Clin Res**, v. 14, n. 5, p. 335-339, 1988.

LAM, M. M. C. *et al.* A genomic surveillance framework and genotyping tool for Klebsiella pneumoniae and its related species complex. **Nat communications**, v. 12, n. 1, p. 4188, 2021

LEBRETON, F. *et al.* Characterization of KPC-82, a KPC-2 Variant conferring resistance to ceftazidime-avibactam in a carbapenem-nonsusceptible clinical isolate of Citrobacter koseri. **Antimicrob agents chemother**, v. 65, n. 7, p. e00150-21, 2021.

LEE, C. R. *et al.* Global dissemination of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. **Front Microbiol**, v. 7, n. 7, p. 1–30, 2016.

LI, B. *et al.* Molecular pathogenesis of Klebsiella pneumoniae. **Future microbiol**, v. 9, n. 9, p. 1071-1081, 2014.

LI, W.; RAOULT, D.; FOURNIER, P. E. Bacterial strain typing in the genomic era. **FEMS** microbiol rev, v. 33, n. 5, p. 892-916, 2009.

LIAO, W.; LIU, Y.; ZHANG, W. Virulence evolution, molecular mechanisms of resistance and prevalence of ST11 carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in China: a review over the last 10 years. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 23, p. 174-180, 2020.

LIVERMORE, D. M. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. Scand J Infect Dis Suppl, v.78, n. 7, p. 7-16, 1991.

LOBANOVSKA, M.; PILLA, G. Penicillin's discovery and antibiotic resistance: lessons for the future?. **Yale J Biol Med**, v. 90, n. 1, p. 135, 2017.

LOPES, E. *et al.* Epidemiology of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in northern Portugal: Predominance of KPC-2 and OXA-48. **J Glob Antimicrob Resist, v.** 22, p. 349–353, 2020.

MAIDEN, M. C. J. *et al.* MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. **Nat Rev Microbiol**, v. 11, n. 10, p. 728-736, 2013.

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

MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A Colonization, Infection, and the Accessory Genome of Klebsiella pneumoniae. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 8, p. 4, 2018.

MENCACCI, A. *et al.* Typing of nosocomial outbreaks of Acinetobacter baumannii by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. **J clin microbiol**, v. 51, n. 2, p. 603-606, 2013.

MILLS, J. P. *et al.* The epidemiology of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae colonization and infection among long-term acute care hospital residents **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 37, n. 1, p. 55, 2016.

MONTEIRO, J. *et al.* First report of KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 1, p. 333-334, 2009.

MORADIGARAVAND, D. *et al.* Evolution and epidemiology of multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae in the United Kingdom and Ireland. **MBio**, v. 8, n. 1, p. e01976-16, 2017.

MOURA, H. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of invasive and noninvasive Streptococcus pyogenes isolates. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 53, n. 3, p. 333-342, 2008.

MUNOZ-PRICE, L. S. *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of Klebsiella pneumoniae carbapenemases. **Lancet infect dis**, v. 13, n. 9, p. 785-796, 2013.

MUNOZ-PRICE, L. S.; QUINN, J. P. The spread of Klebsiella pneumoniae carbapenemases: a tale of strains, plasmids, and transposons. **Clin infect dis**, v. 49, n. 11, p. 1739-1741, 2009.

MURRAY, C. J. L. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. Microbiologia médica. 4.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2004. 776p

NAVON-VENEZIA, S. *et al.* First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing Klebsiella pneumoniae in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. **Antimicrob agents chemother**, v. 53, n. 2, p. 818-820, 2009.

NEOH, H. *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. **Infect, Genet and Evol**, v. 74, p. 103935, 2019.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in gram-negative bacteria. **Clin Infect Dis**, v. 69, n. Supplement-7, p. S521-S528, 2019.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report recommendations: the review on antimicrobial resistance; Disponível em: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final paper_with cover.pdf>. Acesso em: 2 junho 2023

ODSCHUN, R.; ULLMANN, U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin microbiol rev**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

OFEK, I.; DOYLE, R. J. Bacterial adhesion to cells and tissues. Chapman Hall. Inc., New York, NY, p. 324-334, 1994.

OMS/OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde; OMS -Organização Mundial da Saúde https://www.paho.org/pt/noticias/27-2-2017-oms-publica-lista-bacterias-para-quais-se-necessitam-novos-antibioticos Acesso: 5 junho de 2023

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde; OMS -Organização Mundial da Saúde. Alerta Epidemiológico Surgimento e aumento de novas combinações de carbapenemases em Enterobacterales na América Latina e no Caribe 22 de outubro de 2021. Brasilia, D.F.: OPAS/OMS, 2021.

ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F. Serotyping of Klebsiella. **Methods Microbiol**, v.14, p.143–164, 1984.

PASCHOAL DA SILVA, R. P. *et al.* CRONOLOGIA DA EMERGÊNCIA GLOBAL DE CARBAPENEMASES EM BACILOS GRAM-NEGATIVOS. **Saber Digital**, v. 10, n. 2, p.43-61, 2017.

PATEL, R. A moldy application of MALDI: MALDI-ToF mass spectrometry for fungal identification. **J Fungi**, v. 5, n. 1, p. 4, 2019.

PEREIRA, P. S. *et al.* Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 2, p. 312-316, 2013.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin microbiol rev**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Genetic structure at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-58 in Acinetobacter baumannii. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, p. 1442–1448, 2006.

POIREL, L. *et al.* GES-2, a class A β -lactamase from Pseudomonas aeruginosa with increased hydrolysis of imipenem. **Antimicrob agents chemother**, v. 45, n. 9, p. 2598-2603, 2001.

PRADO-VIVAR, M. B. *et al.* Molecular typing of a large nosocomial outbreak of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria in the biggest third level hospital of Quito, Ecuador. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 19, p. 328-332, 2019.

RARO, O. H. F. *et al.* Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae From Transplanted Patients in Brazil: Phylogeny, Resistome, Virulome and Mobile Genetic Elements Harboring bla KPC–2 or bla NDM–1. **Front Microbiol**, v. 11, p. 1563, 2020.

REIL, M. *et al.* Recognition of Clostridium difficile PCR-ribotypes 001, 027 and 126/078 using an extended MALDI-TOF MS system. **Eur j clin microbiol infect dis**, v. 30, p. 1431-1436, 2011.

RHEE, J. *et al.* KPC-producing extreme drug-resistant Klebsiella pneumoniae isolate from a patient with diabetes mellitus and chronic renal failure on hemodialysis in South Korea. **Antimicrobial agents chemother**, v. 54, n. 5, p. 2278, 2010.

RÖDEL, J. *et al.* Use of MALDI-TOF mass spectrometry to detect nosocomial outbreaks of Serratia marcescens and Citrobacter freundii. **Eur j clin microbiol infect dis**, v. 38, p. 581-591, 2019.

RODRIGUES, C. *et al.* Identification of Klebsiella pneumoniae, Klebsiella quasipneumoniae, Klebsiella variicola and related phylogroups by MALDI-TOF mass spectrometry. **Front microbiol**, v.7, n.9, p.3000, 2018.

RODRIGUES, C. *et al.* Elucidating constraints for differentiation of major human Klebsiella pneumoniae clones using MALDI-TOF MS. **Eur j clin microbiol infect dis**, v. 36, n. 2, p. 379-386, 2017.

RODRÍGUEZ-MEDINA, N. *et al.* Klebsiella variicola: an emerging pathogen in humans. **Emer microb infects**, v. 8, n. 1, p. 973-988, 2019.

ROH, K. H. *et al.* Isolation of a Klebsiella pneumoniae isolate of sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Korea. **Korean J Lab Med**, v. 31, n. 4, p. 298, 2011.

ROJAS, L. J. *et al.* An Analysis of the Epidemic of Klebsiella pneumoniae Carbapenemase-Producing K. pneumoniae: Convergence of Two Evolutionary Mechanisms Creates the 'Perfect Storm'. **J. Infect. Dis**, v. 217, n. 1, p. 82–92, 2017.

ROSENBERG, E. et al. The Prokaryotes-A Handbook on the Biology of Bacteria. 2006

RUSSO, T. A. *et al.* Hypervirulent K. pneumoniae secretes more and more active ironacquisition molecules than "classical" K. pneumoniae thereby enhancing its virulence. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26734, 2011.

RYZHOV, V.; FENSELAU, C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. **Anal Chem,** v. 73, p. 746–50, 2001.

SAMUELSEN, Ø. et al. Emergence of clonally related Klebsiella pneumoniae isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. **J antimicrob chemother**, v. 63, n. 4, p. 654-658, 2009.

SAKKAS, H. *et al.* antimicrobial resistance in bacterial pathogens and detection of carbapenemases in Klebsiella pneumoniae isolates from hospital wastewater. **Antibiotics**, v. 8, n. 3, p. 85, 2019.

SARSHAR, S.; MIRNEJAD, R.; BABAPOUR, E. Frequency of blaCTX-M and blaTEM Virulence Genes and Antibiotic Resistance Profiles among Klebsiella pneumoniae Isolates in Urinary Tract Infection (UTI) Samples from Hashtgerd, Iran. **Rep Biochem Mol Biol**, v. 10, n. 3, p. 412, 2021.

SATLIN, M. J. *et al.* Multicenter clinical and molecular epidemiological analysis of bacteremia due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) in the CRE epicenter of the United States. **Antimicrob agents chemother**, v. 61, n. 4, p. 10.1128/aac. 02349-16, 2017.

SAUGET, M. *et al.* Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria? **Trends microbiol**, v. 25, n. 6, p. 447-455, 2017.

SILVEIRA, M C *et al*. Genetic basis of antimicrobial resistant gram-negative bacteria isolated From bloodstream in Brazil. **Frontiers in medicine**, v. 8, p. 635206, 2021.

SIMOONS-SMIT, A. M.; VERWEIJ-VAN, V. A. M; MACLAREN, D. M. The role of K antigens as virulence factors in Klebsiella. **J med microbiol**, v. 21, n. 2, p. 133-137, 1986.

SINGHAL, N. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Front Microbiol**, v. 6, p. 791, 2015.

SMITH, M. E. *et al.* Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in Klebsiella pneumoniae isolates. **J Antimicrob Chemother**, v. 51, n. 3, p. 711-714, 2003.

STEENSELS, D. *et al.* MALDI-TOF MS typing of a nosocomial methicillin-resistant Staphylococcus aureus outbreak in a neonatal intensive care unit. **Acta Clin Belg**, v. 72, n. 4, p. 219-225, 2017.

TACCONELLI, E *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. The Lancet infectious diseases, v. 18, n. 3, p. 318-327, 2018.

TANAKA, K. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel lecture). **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 42, n. 33, p. 3860-3870, 2003.

TIJET, N. *et al.* Molecular characterization of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)producing Enterobacteriaceae in Ontario, Canadá, 2008-2011. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e116421, 2014.

TOOKE, C. L. *et al.* β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **J mol biol**, v. 431, n. 18, p. 3472-3500, 2019

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. J. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends microbiol**, v. 11, n. 10, p. 479-487, 2003.

VÁSQUEZ-PONCE, F. *et al.* Detecting KPC-2 and NDM-1 Coexpression in Klebsiella pneumoniae Complex from Human and Animal Hosts in South America. **Microbiol Spectr**, v. 10, n. 5, p. e01159-22, 2022.

VÁZQUEZ-CABRERA N, et al., Evolución histórica de la Organización Mundial de la Salud

y la resistencia a los antimicrobianos. (2023),

47:51.<(https://iris.paho.org/handle/10665.2/57141>

VEENEMANS, J. *et al.* Comparison of MALDI-TOF MS and AFLP for strain typing of ESBL-producing Escherichia coli. European **J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 35, n. 5, p. 829–838, 2016.

WALSH, C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistence, ASM Press: Washington, 2003.

WANG, G. *et al.* The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of Klebsiella pneumoniae. **Int J Environ Res Public Health**, v. 17, n. 17, p. 6278, 2020.

WHO. Global Priority List of Antibiotic-resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Geneva: **World Health Organization**. 2017.

WHO. Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa in health care facilities. **WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee**, 2017.

WILLIAMS, J.D. β-lactamases and β-lactamase inhibitors. **Inter. J. Antimicrob. Agents**, v. 12, p. 3-7, 1999.

WOODFORD, N. *et al.* Outbreak of Klebsiella pneumoniae producing a new carbapenemhydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. **Antimicrob agents chemother**, v. 48, n. 12, p. 4793-4799, 2004.

WYRES, K. L.; HOLT, K. E. Klebsiella pneumoniae as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. **Curr Opin Microbiol**, v. 45, p. 131-139, 2018.

WYRES, K. L.; LAM, M. M. C; HOLT, K. E. Population genomics of Klebsiella pneumoniae. **Nat Rev Microbiol**, v. 18, n. 6, p. 344-359, 2020.

YIGIT, H. *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenemresistant strain of Klebsiella pneumoniae. **Antimicrob agents chemother**, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, 2001.

ZHOU, Y. *et al.* High-risk KPC-producing Klebsiella pneumoniae lack type I RM systems. **Int J Antimicrob Agents**, v. 56, n. 2, p. 106050, 2020.