

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBÊRLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia aplicadas

**Epidemiologia Clássica e Molecular de *Klebsiella pneumoniae* Resistente em
Hospitais Terciários de Uberlândia – MG**

Camila Peredo Ramirez

Uberlândia – MG

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia aplicadas

**Epidemiologia Clássica e Molecular de *Klebsiella pneumoniae* Resistente em
Hospitais Terciários de Uberlândia – MG**

Dissertação apresentada ao Colegiado
do Programa de Pós-graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre.

Camila Peredo Ramirez

Orientadora: Profa. Dra. Rosiniede Marques Ribas

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Pinto Gontijo- Filho

Uberlândia – MG

2025

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

R173	Ramirez, Camila Peredo, 1995-
2025	Epidemiologia Clássica e Molecular de <i>Klebsiella pneumoniae</i> Resistente em Hospitais Terciários de Uberlândia – MG [recurso eletrônico] / Camila Peredo Ramirez. - 2025. Orientadora: Rosineide Marques Ribas. Coorientadora: Paulo Pinto Gontijo Filho. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2025.189 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Imunologia. I. Ribas, Rosineide Marques, 1974-, (Orient.). II. Gontijo Filho, Paulo Pinto, 1941-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título. CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
 Aplicada
 Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de
 Pós-Graduação em: Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, número 307 do PPGIPA				
Data:	Dez de março de dois mil e vinte e cinco	Hora de início:	14 h	Hora de encerramento:	16h e 30 min
Matrícula do Discente:	12312IPA001				
Nome do Discente:	Camila Peredo Ramirez				
Título do Trabalho:	Epidemiologia de <i>Klebsiella pneumoniae</i> com produção de CTX-M-15 e KPC em Ambiente Hospitalar em Uberlândia – MG				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Epidemiologia das doenças infecciosas e crônico-degenerativas				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Epidemiologia Molecular de Patógenos Virulentos e Interação Bactéria-Hospedeiro				

Reuniu-se de forma remota, dia dez de março de dois mil e vinte e cinco, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: Sabrina Royer - UFU; Vinicius Lopes Dias - UNITRI e Rosineide Marques Ribas - UFU, orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Sr(a). Rosineide Marques Ribas, apresentou a Comissão Examinadora e o(a) candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao(à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do(a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ulmada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre(a).

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Rosineide Marques Ribas, Professor(a) do Magistério Superior**, em 10/03/2025, às 16:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sabrina Royer, Professor(a) do Magistério Superior**, em 10/03/2025, às 16:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **VINICIUS LOPES DIAS, Usuário Externo**, em 10/03/2025, às 16:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6125717** e o código CRC **2BF4623B**.

*Dedico este trabalho a Deus, minha família,
professores e colegas do laboratório que
contribuíram para terminar este trabalho.*

“Uma experiência nunca é um fracasso, pois sempre demonstra algo.”

Thomas Edison

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, minha mãe Rosario, a meus irmãos Sofia e Leonardo que me apoiaram com muito amor e dedicação em toda esta trajetória do mestrado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas, por todo o trabalho e paciência ao longo destes dois anos. Você se tornou um grande apoio para a conclusão deste trabalho seu aporte e dedicação estão no meu coração sempre.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho, por ser uma grande referência de pesquisador e pelas contribuições a este trabalho

Aos meus amigos, minha segunda família sem eles não seria feita nada, obrigada pelo apoio emocional sempre: Danny, Oli, Mary, Nancy, Mariana, Betty, Yuli, Stefy, Sara, Isa, Pao, Luis, Edgar, Pablo, David, Carito, Thiago, Duarte e muitos mais que formaram parte desta trajetória.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Molecular (Micromol), que se tornaram minha família de trabalho e me receberam com muito afeto, obrigada Vitelhe por me ajudar com as escritas e leituras, Elias por me introduzir no laboratório.

Às técnicas do Micromol Cristiane e Licia, por todo o apoio e ajuda com minhas dúvidas no laboratório.

Aos colegas do PPIPA, especialmente que compartilharam o tempo de estudo comigo companheirismo de vocês facilitou esta trajetória.

Às secretárias do PPIPA Lucélia e Cláudia.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior - CAPES, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo financiamento e bolsa que me permitiram dedicar totalmente a este trabalho.

Todos vocês foram essenciais para terminar esta jornada. Obrigado!

RESUMO

O surgimento e disseminação de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos β -lactâmicos com destaque aos carbapenêmicos é uma ameaça significativa à eficácia terapêutica, resultando em altas taxas de mortalidade. O estudo da epidemiologia das infecções causadas por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (CRKP) é importante para compreender a disseminação de genes de virulência e resistência; assim como as taxas de mortalidade por isolados de CRKP na cidade de Uberlândia. Primeiramente, o estudo buscou analisar a disseminação de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL e carbapenemases no ambiente hospitalar. Adicionalmente, identificar as variáveis associadas à mortalidade por bacteremia por *K. pneumoniae*, com especial atenção ao impacto da terapia combinada direcionada. Para responder ao primeiro objetivo, isolados de *K. pneumoniae* foram selecionados aleatoriamente em dois hospitais terciários em Minas Gerais, Brasil. Os isolados, que eram resistentes aos carbapenêmicos, foram avaliados para os genes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{VIM}, *qnrA*, *aadA1*, *entB*, *kfu*, *ureA*, *wabG*, *allS*, *Aero* e *rmpA* usando reação em cadeia da polimerase (PCR). Todos os amplicons de PCR *bla*_{CTX-M-15} foram analisados quanto às relações genéticas por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Para o segundo objetivo os prontuários de 109 pacientes (recuperados durante o período de 2011 a 2019) foram revisados para avaliar os fatores de risco para bacteremia por CRKP. A relação entre os dados demográficos e clínicos do paciente e a multirresistência (MDR) foi analisada. Os desfechos primários foram 30 dias de mortalidade. O excesso de mortalidade foi calculado nos seguintes grupos: *K. pneumoniae* multirresistente, *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos e *K. pneumoniae* sensível a carbapenêmicos. A análise univariada foi feita para identificar fatores associados à mortalidade em 30 dias. Na primeira fase do estudo se observou uma alta prevalência de genes de resistência e virulência em isolados de *K. pneumoniae*. Os genes de resistência incluíram ESBLs (*bla*_{CTX-M-15} 25,5%, *bla*_{TEM} 96,1%, *bla*_{SHV} 92,2%) e carbapenemases (*bla*_{KPC}: 31,4%, *bla*_{VIM}: 54,9%, *bla*_{NDM}: 25,5%). Genes de virulência como *entB* (84,3%), *kfu* (86,3%), *ureA* (90,2%), *wabG* (94,1%), *allS* (11,8%), *Aero* (68,6%) e *rmpA* (9,8%) também foram comumente prevalentes. As infecções respiratórias (32,7%) foram as mais comuns, seguidas pela colonização retal (24,7%). A genotipagem identificou três clones dominantes (A, B, E), com padrões de distribuição geográfica. Para o segundo objetivo foi demonstrado que 64,2% dos isolados eram resistentes a carbapenêmicos, e terapia empírica inapropriada foi observada em 62,4% dos pacientes. Na análise univariada, a

hemodiálise foi um fator de risco de mortalidade($p=0,0238$). As cepas resistentes aos carbapenêmicos foram associadas ao excesso de mortalidade (12,95%), enquanto as cepas multirresistentes tiveram uma taxa de excesso de mortalidade mais baixa (4,51%). Este estudo destaca a prevalência alarmante de genes de resistência e virulência em *K. pneumoniae*, enfatizando seu papel em infecções graves. As altas taxas de resistência aos carbapenêmicos e o excesso de mortalidade associado ressaltam a necessidade urgente de melhores medidas de prevenção, controle e terapias antimicrobianas personalizadas em ambientes hospitalares. Essas descobertas fornecem insights críticos para o avanço das estratégias de gerenciamento de infecções e a redução da carga de infecções multirresistentes.

Palavras chave: *Klebsiella pneumoniae*, mortalidade, virulência, carbapenêmicos, Brasil.

ABSTRACT

The emergence and spread of β -lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains, particularly those resistant to carbapenems, pose a significant threat to therapeutic efficacy, resulting in high mortality rates. Studying the epidemiology of infections caused by carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (CRKP) is crucial for understanding the dissemination of virulence and resistance genes, as well as the distribution of mortality rates associated with CRKP isolates in the city of Uberlândia. Initially, the study aimed to analyze the spread of *K. pneumoniae* producing ESBLs and carbapenemases in hospital settings. Additionally, it sought to identify variables associated with mortality due to *K. pneumoniae* bacteremia, with a particular focus on the impact of targeted combination therapy. To address the first objective, *K. pneumoniae* isolates were randomly selected from two tertiary hospitals in Minas Gerais, Brazil. These carbapenem-resistant isolates were assessed for the presence of *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{VIM}, *qnrA*, *aadA1*, *entB*, *kfu*, *ureA*, *wabG*, *allS*, *Aero*, and *rmpA* genes using polymerase chain reaction (PCR). All *bla*_{CTX-M-15} PCR amplicons were analyzed for genetic relationships via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). For the second objective, medical records of 109 patients (collected between 2011 and 2019) were reviewed to evaluate risk factors for CRKP bacteremia. The relationship between patients' demographic and clinical data and multidrug resistance (MDR) was analyzed. The primary outcomes were 30-day mortality rates. Excess mortality was calculated for the following groups: multidrug-resistant *K. pneumoniae*, carbapenem-resistant *K. pneumoniae*, and carbapenem-sensitive *K. pneumoniae*. A univariate analysis was conducted to identify factors associated with 30-day mortality.

In the first phase of the study, a high prevalence of resistance and virulence genes was observed in *K. pneumoniae* isolates. Resistance genes included ESBLs (*bla*_{CTX-M-15} 25.5%, *bla*_{TEM} 96.1%, *bla*_{SHV} 92.2%) and carbapenemases (*bla*_{KPC} 31.4%, *bla*_{VIM} 54.9%, *bla*_{NDM} 25.5%). Virulence genes such as *entB* (84.3%), *kfu* (86.3%), *ureA* (90.2%), *wabG* (94.1%), *allS* (11.8%), *Aero* (68.6%), and *rmpA* (9.8%) were also commonly found. Respiratory infections (32.7%) were the most frequent, followed by rectal colonization (24.7%). Genotyping identified three dominant clones (A, B, and E) with distinct geographic distribution patterns. For the second objective, it was demonstrated that 64.2% of isolates were resistant to carbapenems, and inappropriate empirical therapy was observed in 62.4% of patients. In the univariate analysis, hemodialysis was identified as a mortality risk factor ($p=0.0238$). Carbapenem-resistant strains were associated with an excess mortality rate of 12.95%, while multidrug-resistant strains had the lowest excess mortality rate (4.51%).

This study highlights the alarming prevalence of resistance and virulence genes in *K. pneumoniae*, emphasizing its role in severe infections. The high carbapenem resistance rates and associated excess mortality underscore the urgent need for improved prevention, control measures, and personalized antimicrobial therapies in hospital settings. These findings provide critical insights into advancing infection management strategies and reducing the burden of multidrug-resistant infections.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, mortality, virulence, carbapenems, Brazil.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

>	Maior
<	Menor
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
β	Beta
AIM-1	<i>Australian imipenemase</i> ; Imipimase Australian
BKC-1	<i>Brazilian Klebsiella Carbapenemase-1</i> ; <i>Klebsiella carbapenemase -1</i>
BGN	Bacilos Gram Negativos
BHI	Brain Heart Infusion; Caldo infusão cérebro-coração
BSI	Blood Stream Infection; Infecções de corrente sanguínea
CDC	Centers of Disease Control and Prevention; Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CI	Confidence interval; Intervalo de confiança
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute; Instituto de Padrões Clínicos e laboratoriais.
CRAB	Carbapenem- resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> ; <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos.
CRE	Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; Enterobacteriaceae resistente aos carbapenêmicos
CRKP	Carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos
CSKP	Carbapenem-susceptible <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae</i> susceptible a os carbapenêmicos
CVC	Cateter venoso central
DIM-1	Dutch-imipenemase 1; Imipenemase holandesa 1
DNA	Desoxyribonucleic acid; Àcido Desoxirribonucleico
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic Acid; Ácido etileno-diamino tetracético
ESBL	Extendend spectrum β-lactamase; β-lactamase de amplo espectro
et al.	E colaboradores
GIM	German imipenemase; Imipenemase alemã
GNB	Gram-negative bacilini; Bacilos gram negativos.

h	Horas
HAI	Healthcare associated infection; Infecções relacionadas à assistência à saúde
HMV	Hipermucoviscoso
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
IMP	Imipenemase
ICU	Intensive Care Unit; Unidade de terapia intensiva
KPC-2	KPC-2 producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase de tipo KPC-2
LPS	Lipopolissacarídeo
MBL	Metallo- β -lactamase
MDR	Multidrug-resistant, Multirresistente
MDRGN	Multidrug-resistant Gram-negative bacteria, Bacilos gram negativos multirresistente
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
n	Number; Número
NDM-1	New Delhi MBL; MBL de Nova Delhi
nm	Nanômetro
NMDR	Non – multidrug resistant; não MDR
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds ratio; Razão de probabilidades
OXA	Oxacilinas
P	Valor de p
PAV	Pneumonia associada a Ventilação
PCR	Polymerase Chain Reaction; Reação em cadeia de polimerase.
PFGE	Pulse -Field Gel Electrophoresis; Electroforese em gel de campo pulsado.
SIM-1	Seúl imipenemase; Imipenemase de Seúl.
ST	Sequence Type; Tipagem de sequência
TBE	Tris, Borate and EDTA; Tris, ácido bórico e EDTA
TE	Tris and EDTA; Tris e EDTA
TSB	Tryptic soy broth; Caldo Triptona Soja
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages; Método de grupo de pares não ponderados usando medidas aritméticas.
UTI	Unidade de terapia intensiva
VIM	Verona imipenemase; Imipenemase de Verona

VRE	Vancomycin Resistant Enterococcus faecium; Enterococcus faecium resistente a Vancomicina
WHO	World health organization; Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

Apresentação	17
Capítulo I: [Fundamentação Teórica]	20
1. Infecções relacionadas à assistência a Saúde	21
2. Uso de antimicrobianos e Resistência em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
3. Aspectos da virulência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> abordados na dissertação.	26
4. Conclusão	28
5. Referências	30
Capítulo II:[Dissemination of nosocomial ESBL- and carbapenemase-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates]	43
SUMMARY	44
1. Introduction	46
2. Methods	46
3. Results	48
4. Discussion.....	49
5. Conclusions	52
Competing interests	52
Acknowledgements	52
Funding information	52
Ethical statement.....	53
6. References	54
Capítulo III:[Mortality Associated with Bacteremia Caused by Carbapenem- Resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i>: The Crucial Role of Therapy in Clinical Outcome]	62
ABSTRACT	63
1. Introduction:	64
2. Methods	64
3. Results	66
4. Discussion.....	67
5. Conclusion.....	69
Funding information	69
Acknowledgments	69
Ethical statement.....	69

6. References:	70
4. Capítulo IV:[Considerações finais]	78

APRESENTAÇÃO

Klebsiella pneumoniae é um patógeno oportunista Gram-negativo com alto impacto na saúde mundial. Atualmente, a alta prevalência de *K. pneumoniae* multirresistente de origem hospitalar é considerada um problema de saúde global, especialmente devido às dificuldades no tratamento dessas infecções e à alta mortalidade associada. Embora a presença e transmissão desse patógeno tenha ganhado destaque nas últimas décadas, o problema é ainda mais grave em países de baixa e média renda, como o Brasil. (Rosenthal et al., 2024; OMS,2024)No Brasil, infelizmente, os recursos financeiros destinados à saúde são limitados, há o uso excessivo e indiscriminado de antimicrobianos, o que contribui para os elevados índices de bactérias multirresistentes. Além disso, a falta crônica de laboratórios de microbiologia, a escassez de dados científicos e a ineficácia das políticas de controle existentes tornam o controle das infecções causadas por esses microrganismos multirresistentes um grande desafio(Fortaleza et al., 2017; Lu et al., 2018).

K. pneumoniae é frequentemente isolada em amostras clínicas, sendo responsável por uma variedade de infecções, como infecções do trato urinário, pneumonia, e bacteremia entre outras (Podschun; Ullmann, 1998; Brisse et al., 2006). Dados do estudo multicêntrico SENTRY, realizado entre 1997 e 2016 para a América Latina, mostram que *K. pneumoniae* ocupa a terceira posição entre as causas de infecções em pacientes hospitalizados (13,6%). Além disso, é o patógeno mais prevalente (29,4%) em infecções do trato respiratório inferior em pacientes hospitalizados (Leal et al.,2019). No Brasil, o estudo de Stüker e colaboradores no 2021 mostrou que *K. pneumoniae* foi o germe mais frequentemente isolado (56%), seguido por *Acinetobacter baumannii* (32%), *Pseudomonas aeruginosa* (12%).

Muitos dos microorganismos que pertencem à família Enterobacteriaceae causam infecções letais difíceis de tratar; de os quais *K. pneumoniae* representa uma preocupação crítica segun a Organização Mundial da Saúde(OMS) ; nas ultimas décadas *K. pneumoniae* resistente aos carbapenemicos (CRKP) emergiu como um importante patógeno capaz de causar infecções adquiridas na comunidade, nos hospitais, e em individuos saudáveis, com alto índice de morbidade e mortalidade.(CDC,2013; OMS, 2024)

Entre os mecanismos de resistência importantes em Bacilos Gram-negativos, destaca-se as carbapenemases. E, entre elas, *K. pneumoniae* carbapenemase (KP-KPC), que pertence à classe A de Ambler e ao grupo funcional 2f de Jacoby e Medeiros(1995).A dificuldade no tratamento de infecções graves por fenótipos resistentes aos carbapenêmicos, como a KP-KPC, levou a reutilização das polimixinas (polimixina B e colistina) em nível mundial como última opção no tratamento dessas infecções. Entretanto, já tem sido relatada resistência as polimixinas por bactérias que são normalmente susceptíveis a essas drogas, complicando consideravelmente o tratamento.

Devido a rápida disseminação mundial de resistência em *K. pneumoniae* assim como em outros patógenos hospitalares a detecção e o conhecimento da epidemiologia e características moleculares relacionadas ao seu genoma e de fundamental importância para melhor conhecimento e desenvolvimento de estratégias mais adequadas quanto ao tratamento, prevenção e controle das infecção associadas.

A presente dissertação de mestrado foi realizada no Laboratório de Microbiologia Molecular do Instituto de Ciencias Biomedicas da Universidade Federal de Uberlândia – UFU e contou com a participação de hospitais de segundo e terceiro nível de atenção da cidade de Uberlândia.

Esse trabalho tem como objetivos principais: (i) analisar a disseminação de betalactamases de espectro estendido e carbapenemases produzidas por isolados clínicos de *K. pneumoniae* na cidade de Uberlândia; (ii) verificar a presença de genes de virulência e resistência de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro recuperadas de hospitais de diferentes regiões da cidade de Uberlândia no ano 2021; (iii) avaliar os fatores de risco e o uso da terapia antimicrobiana inapropriada nos pacientes com infecções graves por *K. pneumoniae* internados nas UTIs de um hospital terciário da cidade de Uberlândia entre os anos 2011 e 2019.

Esta tese foi subdividida em quatro capítulos, conforme apresentado a seguir:

Capítulo I – Fundamentação Teórica: Apresenta uma revisão da literatura atualizada sobre *K. pneumoniae*, a epidemiologia da disseminação de *K. pneumoniae* resistente aos antimicrobianos de amplo espectro; os mecanismos de disseminação dos genes de virulência e resistência de este microorganismo, assim como o papel da terapia antimicrobiana atual no tratamento das infecções causadas por isolados resistentes de *K. pneumoniae* aos antimicrobianos.

Capítulo II – Dissemination of nosocomial ESBL- and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. Artigo será submetido para publicação no Journal of Medical Microbiology (Fator de Impacto 3.196, Qualis CAPES A4 - Ciências Biológicas III) em 2025, apresentando um estudo sobre a disseminação de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro nos principais centros médicos públicos da cidade de Uberlândia. No estudo foi descrito a presença de genes de resistência e virulência e adicionalmente foi realizada a análise do perfil clonal das cepas coletadas no período de estudo.

Capítulo III – Mortality Associated with Bacteremia Caused by Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: The Crucial Role of Therapy in Clinical Outcome. Artigo será submetido para publicação no Microbial Drug Resistance (Fator de Impacto 2.3, Qualis CAPES A4 - Ciências Biológicas III) em 2025. Apresentando um estudo retrospectivo de 8 anos (2011 ao 2019) de infecções causadas por *K. pneumoniae* multiresistente na unidade de terapia intensiva da Universidade Federal de Uberlândia e o impacto do uso inadequado de antimicrobianos nestes pacientes.

Capítulo IV – Considerações finais. Principais resultados, aplicabilidade e contribuições de este trabalho para a sociedade.

Capítulo I

Fundamentação Teórica

1. Infecções relacionadas à assistência a Saúde

Estudos multicêntricos realizados em diferentes regiões do mundo destacam a alta prevalência de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), especialmente em unidades de terapia intensiva (UTIs) (Braga et al., 2018 ; Fortaleza et al., 2017 ; Lou et al.,2022; Ruvinsky et al., 2024). Um estudo realizado entre 2011 e 2013, em 152 hospitais de 10 estados brasileiros, revelou uma taxa geral de prevalência de IRAS de 10,8%, com variações regionais: 12,2% na região Norte, 11,3% no Centro-Oeste, 10,2% no Sudeste, 9,3% no Nordeste e 8,3% no Sul (Fortaleza et al., 2017). Esses dados confirmam a necessidade de priorizar o controle de IRAS em políticas públicas de saúde, especialmente em países em desenvolvimento como o Brasil, onde a infraestrutura hospitalar e os recursos para prevenção são frequentemente insuficientes.

Um estudo multicêntrico, realizado em UTIs de 28 hospitais no estado de Minas Gerais, mostrou uma prevalência de IRAS de 51,2% (Braga et al., 2018), valor significativamente maior do que o observado em UTIs dos Estados Unidos (6,1%) e da Europa (48,4%) (Richards et al., 2000; Alberti et al., 2002; Lisboa et al., 2007; Vincent et al., 2009; Silva et al., 2012). Esse estudo reforçou a pneumonia como o tipo de infecção mais frequente, seguida por infecções de corrente sanguínea (ICS) e do trato urinário, que juntas representaram 90,8% das IRAS detectadas (Braga et al., 2018). Esses achados evidenciam a gravidade do problema em países com menos recursos, onde a alta frequência de procedimentos invasivos, a sobrecarga de trabalho dos profissionais de saúde e a falta de adesão a práticas básicas de higiene contribuem para a disseminação de patógenos resistentes, como a *K. pneumoniae*.

K. pneumoniae é um dos principais patógenos associados a infecções relacionadas à assistência à saúde especialmente em UTIs (Vincent et al., 2009; Cardoso et al.,2014;Richards; Thursky; Buising, 2003). Estudos mostram que essa bactéria é frequentemente isolada em infecções de corrente sanguínea e pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAV)(Lanks et al., 2019;Nakamura-Silva et al., 2021). Em países em desenvolvimento, como o Brasil, a *K. pneumoniae* é um dos principais agentes etiológicos de ICS secundárias, frequentemente associada a resistência a cefalosporinas de amplo espectro e, mais recentemente, a carbapenêmicos (ANVISA, 2013;Fortaleza et al., 2017). Essa resistência antimicrobiana contribui para o aumento da morbidade e mortalidade em pacientes críticos, além de elevar os custos hospitalares e o tempo de

internação (Vilar-Compte; Camacho-Ortiz; Ponce-de-León, 2017; Ramos-Castañeda et al., 2018).

As ICS causadas por *K. pneumoniae* representam um desafio significativo, especialmente em UTIs do Brasil (Braga et al., 2018, Fortaleza et al., 2017). A *K. pneumoniae* também é um dos principais patógenos associados a essas infecções, frequentemente relacionada ao uso de dispositivos invasivos, como cateteres venosos centrais (CVC), tubos endotraqueais, cateter urinário (CDC, 2011; Carrara, 2016; ANVISA, 2017). A ICS primária, que ocorre devido à colonização do cateter venoso central, é particularmente preocupante, pois a bactéria pode formar biofilmes, estruturas que protegem os microrganismos contra antibióticos e o sistema imunológico do hospedeiro (Gominet et al., 2017; Mirbag et al., 2024).

Na última década a incidência de ICS por *K. pneumoniae* vem aumentando, refletindo a dificuldade na implementação de medidas básicas de prevenção e controle de infecções (Sabatier; Peredo; Vallés; Ferrer, 2009; Maseda et al., 2011). Em UTIs, onde os pacientes estão mais suscetíveis devido ao uso de dispositivos invasivos e à gravidade de suas condições clínicas, a *K. pneumoniae* é frequentemente isolada em culturas sanguíneas (Mirbag et al., 2024; Rosenthal et al., 2024). A infecção secundária, onde o foco inicial está em outro local, como o trato urinário ou pulmões, também é comum, especialmente em pacientes com comorbidades ou imunossuprimidos (Ma et al., 2024; Monteiro et al., 2024). Além disso, a *K. pneumoniae* é conhecida por sua resistência a múltiplos antibióticos, incluindo cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos, o que complica o tratamento e aumenta o risco de morbidade e mortalidade (Esposito et al., 2023; Rosenthal et al., 2024).

A presença de *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos em infecções como ICS e PAV está diretamente relacionada a piores desfechos clínicos, incluindo maior tempo de internação e custos hospitalares (Ponce-de-León, 2017; Morgado et al., 2022). A identificação precoce da *K. pneumoniae* e a determinação de seu perfil de resistência são fundamentais para o manejo adequado dessas infecções. A implementação de medidas de controle de infecção, como a higienização das mãos e o uso adequado de dispositivos invasivos, é essencial para prevenir a disseminação dessa bactéria em ambientes hospitalares.

No Brasil, os problemas relacionados à resistência antimicrobiana são ainda mais pronunciados, refletindo a alta taxa de consumo de antibióticos, especialmente os β -lactâmicos, incluindo aqueles de última geração, como os carbapenêmicos e as fluoroquinolonas (Moreira et al., 2013; Porto et al., 2013; Dantas et al., 2014; Dantas et al., 2017; Ferreira et al., 2018a). O uso inadequado de antibióticos contribui diretamente para piores prognósticos dos pacientes e para o surgimento e disseminação de microrganismos resistentes nos ambientes hospitalares, onde a propagação dessas cepas é facilitada (Tangcharoensathien et al., 2018; Du et al., 2019). Em microrganismos da família Enterobacteriaceae, a resistência aos carbapenêmicos tem aumentado de forma alarmante em todo o mundo, com essas bactérias adquirindo diversos e sofisticados mecanismos de resistência (Perez; Duin, 2013; Iredell; Brown; Tagg, 2016; OMS, 2024).

2. Uso de antimicrobianos e Resistência em *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae é conhecida por sua capacidade de desenvolver resistência a vários antibióticos, incluindo carbapenêmicos, tornando o tratamento desafiador e complicando os resultados dos pacientes (Hendriksen et al., 2019). Essa resistência tem sido um problema crescente em unidades críticas, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, e está associada a fenótipos multirresistentes que dificultam o tratamento e aumentam a necessidade de terapias empíricas com antimicrobianos de amplo espectro (Sampaio e Gales., 2016; Pereira et al., 2018; Li et al., 2023). A resistência aos antimicrobianos é mediada por mutações de genes cromossômicos ou por transferência horizontal de genes, nos quais a bactéria adquire genes de resistência e virulência transportados por elementos genéticos móveis, como transposons, plasmídeos ou integrons, que facilitam a transferência horizontal destes genes o que potencializa a capacidade de sobrevivência da bactéria (Partridge et al., 2018; Li et al., 2023).

A emergência e disseminação de bactérias multirresistentes, como *K. pneumoniae*, tornou-se um problema de saúde pública mundial, resultante do uso abusivo e irracional de antimicrobianos (Gontijo-Filho et al., 2016; Ribas et al., 2021). A resistência aos antimicrobianos, especialmente em bacilos Gram-negativos (BGN), limita as opções terapêuticas eficazes, devido à capacidade desses microorganismos de desenvolver resistência a todos os antimicrobianos disponíveis aumentando as taxas de mortalidade (Poirel et al., 2017; Hendriksen et al., 2019). Estudos na região sudeste do Brasil revelaram um elevado uso de antimicrobianos em hospitais, especialmente em

unidades críticas, com ênfase no uso empírico de carbapenêmicos e polimixinas, o que pode ser relacionado aos elevados índices de resistência demonstrados no país (Moreira et al., 2013; Braga, 2019)

As carbapenemases são β -lactamases, enzimas que hidrolisam a os carbapenêmicos, estes antimicrobianos são a última linha de defesa contra os microrganismos multirresistentes, em especial em infecções por cepas de *K. pneumoniae* (Hu et al., 2024). Estas enzimas são classificadas em dois grandes grupos com base em suas sequências de aminoácidos: as metalo- β -lactamases (classe B), que possuem zinco no sítio ativo e as serina- β -lactamases (classes A C e D) que contém serina em seu sítio ativo. Dentro da classe A, destacam-se as enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), SME (*Serratia marcescens* carbapenemase), IMI (Imipenem carbapenemase), NMC (não metalo carbapenemase) e GES (Guiana extended spectrum β -lactamase) (Queenan; Bush, 2007; Papp-Wallace et al., 2011).

KPC pertence à classe A de β -lactamases e pode estar associada a um fenótipo de pan-resistência, o que significa que as bactérias que a produzem são resistentes a todos os antibióticos disponíveis (Gonçalves et al., 2016). A disseminação global da KPC tem sido documentada em diversos países, incluindo Estados Unidos, Brasil, Argentina e China, com surtos hospitalares frequentemente relacionados à transmissão cruzada entre pacientes e à inadequação das práticas de controle de infecção (Munoz-Price et al., 2013; Nordmann, Poirel, 2014; Chen et al., 2014).

No Brasil, a disseminação de isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC são endêmicas e está associada a surtos hospitalares (Pereira et al., 2013; Monteiro et al 2023). A resistência aos carbapenêmicos representa um problema de saúde pública, a produção de carbapenemases é mediada por plasmídeos que codificam o gene KPC, estes plasmídeos facilitam a disseminação de genes entre diferentes bactérias, contribuindo para a propagação da resistência aos carbapenêmicos em ambientes hospitalares e comunitários (Vásquez et al.; 2023).

A epidemiologia das infecções por *K. pneumoniae* multirresistente tem sido amplamente estudada, a tipagem molecular é essencial para entender a disseminação global desses clones e para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle (Mathers; Peirano; Pitout 2015). Existem diversos tipos de carbapenemases sendo os mais prevalentes no mundo são *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{OXA} (Liao et

al.,2024;Jiang et al.,2024) as cepas resistentes aos carbapenêmicos de *K. pneumoniae* apresentam até 90% do gene *bla*_{KPC-2} (Liao et al., 2024).

Já as β - lactamases de espectro estendido (ESBLs) são enzimas que inativam cefalosporinas de terceira e quarta geração e monobactâmicos; mas não carbapenêmicos e ceftazidima (Lincopan et al.,2006; Bush, Jacoby, 2009). ESBLs são um grupo muito grande e variado de enzimas que são codificados por genes que se encontram em transposons ou plasmídeos, o que favorece a disseminação da resistência e alguns fatores de virulência de *K. pneumoniae* (Bonnet et al.,2004; Husna et al.,2023).

No Brasil, se estima que cerca de 59.2% dos isolados de *K. pneumoniae* são produtoras de ESBLs (Samapio e Gales.,2016) o que o torna uma preocupação muito grande porque está associada a surtos hospitalares muito mais frequentemente (Li et al., 2023). Também as cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL estão associadas a produção de biofilme, fenótipo hiper mucoviscoso (HMV) e outros fatores de virulência que dificultam o tratamento (Mirbag et al., 2024).

Na América do Sul, especialmente no Brasil, as ESBLs predominantes pertencem à família CTX-M(Rocha; Pinto; Barbosa, 2016). Estudos relatam alta frequência do gene *bla*_{CTX-M} entre amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL na América do Sul, Ásia e Europa (Quinteros et al., 2003; Bonnet, 2004; Livermore, Hawkey, 2005; Yan et al., 2006). Na América do Sul a produção de ESBL da família CTX-M são as mais prevalentes, podendo ser classificadas em cinco grupos com base a suas sequências de aminoácidos (Rocha; Pinto; Barbosa, 2016). Além das ESBLs do tipo CTX-M, outras β -lactamases como *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}, também estão associadas a surtos hospitalares significativos (Canton et al.,2012), levando ao uso frequente de carbapenêmicos como última opção terapêutica para infecções graves causadas por *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs (Tamma; Rodriguez Baño, 2017; Morgado et al 2022).

A resistência aos carbapenêmicos tem levado ao aumento do uso de polimixinas, como a colistina, como alternativa terapêutica. No entanto, o uso crescente desses antimicrobianos tem exercido pressão seletiva, favorecendo o desenvolvimento de resistência às polimixinas em bactérias que antes eram suscetíveis a essas drogas (Oliveira et al., 2018). Isso representa uma grande ameaça, uma vez que estamos diante de infecções intratáveis, onde o aspecto mais preocupante é a capacidade desses

microrganismos de transferir genes de resistência para outras espécies bacterianas, o que favorece ainda mais esse cenário (Wang et al.,2018)

Na atualidade, a terapia antimicrobiana combinada é uma das opções terapêuticas para as infecções por *K. pneumoniae*. Em comparação com a monoterapia antimicrobiana, a terapia combinada mostrou maior sucesso no tratamento e menor taxa de mortalidade em pacientes que foram submetidos a esse tratamento(D. Li et al.,2024). O sucesso do tratamento está associado a fatores de risco dos pacientes, como o tipo de infecção, características clínicas da infecção e o uso ou não de terapia antimicrobiana empírica prévia ao tratamento definitivo (D. Li et al., 2024; Hu et al., 2024; Tumbarello et al., 2024)

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica *K. pneumoniae* e outras Enterobacteriaceae produtoras de ESBL e carbapenemases como patógenos críticos e de alta prioridade para a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos (OMS,2024). A compreensão dos mecanismos de resistência e dos fatores que contribuem para a disseminação de ESBLs é essencial para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção, visando reduzir o impacto dessas infecções na saúde global.

3. Aspectos da virulência de *Klebsiella pneumoniae* abordados na dissertação.

Além dos mecanismos de resistência , fatores de virulência, como sistemas de aquisição de ferro e metabolismo de alantoína, contribuem para a patogenicidade de *K. pneumoniae* (Ma et al.,2005;Bachman et al.,2011). A formação de biofilmes e a presença de cápsulas são fatores críticos para a adaptação e persistência desses microrganismos no ambiente hospitalar (Shon et al.,2013; Li et al., 2019)

A cápsula de *K. pneumoniae* é uma proteção polissacarídica ao redor da bactéria, cujas funções são evitar a fagocitose, impedir a ação dos antimicrobianos, a ativação do complemento; por muito tempo foi alvo para tratamento e criação de vacinas contra este patógeno; existem setenta e sete sorotipos de cápsulas, classificados fenotipicamente como K; os mais prevalentes no mundo são os tipos K1 e K2. Sendo o K1 mais importante (Monteiro et al., 2024). O tipo capsular é codificado por os genes *magA* e *wzy* que são específicos para o sorotipo capsular K1, no Brasil como no mundo o sorotipo capsular mais prevalente é o K1(Nakamura-Silva et al., 2021).

Além da cápsula, *K. pneumoniae* tem uma variedade de fimbrias, se reportaram dez tipos de fimbrias, dos quais os mais representativos são as fimbrias de tipo 1 e 3, as quais estão relacionadas a infecções de trato urinário (Monteiro et al., 2024). As fimbrias do tipo 1 se ligam a receptores glicoproteicos que expressam manose em seus sítios de ligação no urotélio; estas proteínas ligantes são codificadas por genes como *fimH*, este gene é considerado uropatogénico e é encontrado na maioria das ITUs causadas por *K. pneumoniae* (Monteiro et al., 2024; Alcántar-Curiel et al., 2013). Enquanto as fimbrias do tipo 3 o gene que codifica estas é o *mrkD*, embora esteja relacionada com infecções do trato urinário, sua importância radica na formação de biofilme, o biofilme produzido por *K. pneumoniae* tem grande capacidade de aderência a distintos tipos de superfícies (Desai et al., 2019), pelo qual geralmente estão associados a infecções graves por uso de dispositivos médicos como cateteres intravasculares e urinários, tubos endotraqueais (Monteiro et al., 2024). Este biofilme é altamente resistente aos antimicrobianos (Cepas et al., 2019; Monteiro et al., 2024)

K. pneumoniae tem um sistema de captação de ferro do hospedeiro que é o KFU (*Klebsiella* Ferric Uptake), o sistema promove a captação de ferro livre pela quelação e promove a capacidade de crescimento e colonização das bactérias (Liao et al., 2024); este sistema pode se detectar na maioria das infecções causadas por cepas hipervirulentas e é codificado pelo gene *kfu*, a presença do gene *kfu* é associada a infecção invasiva e a hipervirulência de *K. pneumoniae* (Monteiro et al., 2024) pelo aporte na capacidade de desenvolvimento e virulência na colonização da bactéria, assim mesmo está associada a cepas resistentes aos carbapenêmicos (Jiang et al., 2024).

Outro mecanismo pelo qual *Klebsiella sp.* se fornece de ferro são os sideróforos, que são proteínas de alta afinidade ao ferro; este é um metal muito importante para o desenvolvimento e virulência da bactéria. *K. pneumoniae* produz uma variedade de sideróforos entre os quais os mais importantes são: enterobactina, Aerobactina, yersiniabactina e salmolinquina (Alcántar-Curiel et al., 2013; Morgado et al., 2022; Kocsis, 2023). Os clusters de estes genes são geralmente transportados por elementos conjugativos ou plasmídeos. (Stanton et al., 2024)

O gene da Aerobactina representa um 90% dos sideróforos mais prevalentes de *K. pneumoniae*, esse gene é transmitido por um plasmídeo que codifica o gene *iucABCDE*, que é caracterizada pela produção de estas proteínas quelantes de ferro (Monteiro et al., 2024; Russo & Gulick., 2019). Em conjunto com o fenótipo

hipermucoviscoso (HMV) dão a característica de hipervirulencia a bactéria. Aerobactina é um sideróforo muito estudado, tem uma correlação muito forte com a hipervirulencia da bactéria; desempenha um papel muito importante no crescimento e sobrevivência de *K. pneumoniae*, e está associado a abscesso hepático primário (Tan et al.,2017).

A alantoína é utilizada por *K. pneumoniae* como fonte de carbono e nitrogênio, o gene *allS* se utiliza como marcador deste sistema, a presença de *allS* está relacionada a cepas hipermucoviscosa o que joga um papel importante na virulência e a patogenicidade da bactéria; assim mesmo está associado a bacteremia secundaria (Isogai et al., 2024; Monteiro et al., 2024); pelo qual as cepas que apresentam este gene, geralmente causam infecções difíceis e são mais prevalentes sorotipo capsular K1(Isogai et al., 2024; Russo e Marr., 2019).

A característica HMV muitas vezes foi associada a hipervirulencia, no entanto a hipervirulencia de *K. pneumoniae* se define como uma série de características fenotípicas e genotípicas somado as características clínicas das infecções que causa. O fenótipo HMV é regulado por um gene chamado *rpmA*, este gene regula a capacidade da bactéria de formar colônias mucoviscosas que são polissacarídeos ancorados na membrana externa da bactéria(eBioMedicine, N.2024) cuja função é evitar a fagocitose mediada por neutrófilos ajudando assim a disseminação bacteriana e infecções metastáticas no hospedeiro (Hyun et al., 2024), este fenótipo hipermucoviscoso se avalia por meio da “string teste” o teste de cordas e também por meio do PCR para detectar a presença do gene *rpmA*(Russo e Marr., 2019).

Muitos estudos associam o fenótipo HMV a cepas causantes de abscesso hepático piogênico e ao sorotipo capsular K1(Cerdeira et al.,2021; Monteiro et al.,2024); por isso que o gene *rmpA* como usa-se como marcador de hipervirulencia em conjunto com os genes *Aero* (codifica o sideróforo Aerobactina), *kfu* (codifica sistema de absorção de ferro) e uma variedade de características clínicas das infecções causadas por este microrganismo (Choby et al., 2019).

4. Conclusão

Em síntese, o estudo sobre a epidemiologia das IRAS no Brasil é de extrema importância, especialmente aquelas causadas por bactérias multirresistentes, como *K. pneumoniae*, devido às dificuldades na implementação de projetos nacionais e à escassez de dados robustos disponíveis na literatura.

Considerando a relevância do tema, este estudo busca contribuir para o preenchimento das lacunas no conhecimento sobre a epidemiologia das IRAS causadas por *K. pneumoniae* no Brasil, sendo um passo crucial para a sistematização das ações voltadas à melhoria da qualidade nos hospitais do país. Além disso, os resultados da pesquisa poderão fundamentar políticas eficazes para a prevenção e o controle de infecções em diversas instituições de saúde.

5. Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Série segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Brasília, DF: Ministério da saúde: p. 1-122, 2017. Disponível em: <http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=pCiWUy84%2BR0%3D>.
- ALBERTI, C. et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Medicine*, Berlim, v. 28, n. 2, p. 108-121, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00134-001-1143-z>.
- ANDRADE, L. N. et al. Expansion and Evolution of a Virulent, Extensively Drug-Resistant (Polymyxin B-Resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 International High-Risk Clone. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 7, p. 2530-2535, 2014. <https://doi.org/10.1128/JCM.00088-14>
- ANDRADE, L. N. et al. Dissemination of blaKPC-2 by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae Species in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, n. 7, p. 3579–3583, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.01783-10>.
- ARDUINO, S. M. et al. Transposons and integrons in colistin-resistant clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* with epidemic or sporadic behaviour. *Journal of Medical Microbiology*, v. 61, n. 10, p. 1417-1420, 2012. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.038968-0>
- BONNET, R. Growing group of extended-spectrum β -lactamase: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2004. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004>
- BRAGA, I. A. et al. Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. *Journal of Hospital Infection*, v. 99, n. 3, p. 318-324, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2018.03.003>.
- CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology*, v. 3, Abr. 2012. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>

CANTÓN, R.; COQUE, T. M. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, v. 9, n. 5, p. 466-475, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.011>

CARDOSO, T. et al. Classification of healthcare-associated infection: a systematic review 10 years after the first proposal. *BMC Medicine*, Londres, v. 12, n. 1, p. 40, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-40>

CARRARA, D. Fisiopatogenia das infecções associadas a cateter intravascular: o papel do biofilme. In: SILVA, A. A.; FEIJÓ, D. F.; LESSA, S. S. Infecção da corrente sanguínea associada ao uso de cateteres vasculares. 4. ed. São Paulo: APECIH, 2016. cap. 3, p. 35-44.

CDC, Center for Disease Control and Prevention. Guideline for the Prevention of Intravascular Catheter-Related Infections. Atlanta, 2011. Disponível em: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/bsi-guidelines-H.pdf>.

CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.

CEPAS, V. et al. Relação entre a formação de biofilme e a resistência antimicrobiana em bactérias Gram-negativas. *Microbial Drug Resistance*, v. 25, n. 1, p. 72-79, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0027>

CERDEIRA, L. et al. A novel hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* ST3994-K2 clone belonging to Clonal Group 86. *Pathogens and Disease*, v. 79, n. 8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftab047>.

CHEN, L. et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends in Microbiology*, v. 22, n.12, p. 686-696, Dez. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.003>

CHIANG, T. T. et al. Estudo multicêntrico sobre desfechos clínicos e fatores de mau prognóstico em pacientes com bacteremia por *Klebsiella pneumoniae* recebendo tratamento com cefoperazona/sulbactam. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 43, n. 9, p. 1777-1785, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10096-024-04892-x>

CHOBY, J. E.; HOWARD-ANDERSON, J.; WEISS, D. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives. *Journal of Internal Medicine*, v. 287, n. 3, p. 283-300, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/joim.13007>

PU, D. et al. “Superbugs” with hypervirulence and carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*: the rise of such emerging nosocomial pathogens in China. *Science Bulletin*, v. 68, n. 21, p. 2658-2670, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scib.2023.09.040>.

DANTAS, R.C. et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: independent risk factors for mortality and impact of resistance on outcome. *Journal of Medical Microbiology*, v.63, n.12, p.1679-1687, 2014. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.073262-0>

DANTAS, R. C. C.; SILVA, R. T. E.; FERREIRA, M. L.; GONÇALVES, I. R.; ARAÚJO, B. F.; DE CAMPOS, P. A.; ROYER, S.; DA FONSECA BATISTÃO, D. W.; GONTIJO-FILHO, P. P.; RIBAS, R. M. Molecular epidemiological survey of bacteremia by multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: the relevance of intrinsic resistance mechanisms. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0176774, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176774>.

DESAI, S.; SANGHRAJKA, K.; GAJJAR, D. A alta adesão e o aumento da morte celular contribuem para a forte formação de biofilme em *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens*, v. 8, n. 4, p. 277, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens8040277>.

DU, X. et al. Predictors of mortality in patients infected with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Infection Control*. [Epub ahead of print], 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.03.003>

eBioMedicine, N. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an old enemy with a more powerful weapon. *EBioMedicine*, v. 108, p. 105402, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.105402>

ESPOSITO, F. et al. Expansão da produção de KPC-2 hipervirulenta associada aos cuidados de saúde *Klebsiella pneumoniae* ST11/KL64 além das configurações hospitalares. *One Health*, v. 17, p. 100594, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100594>

- FERRER, M. et al. Polymicrobial intensive care unit-acquired pneumonia: prevalence, microbiology, and outcome. *Critical Care*, v. 19, n. 1, p. 450, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13054-015-1165-5>
- FERREIRA, M. L. et al. Association of colistin-resistant KPC clonal strains with subsequent infections and colonization and biofilm production. *Microbial Drug Resistance*, v. 24, n. 10, p. 1- 9. 2018a. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0043>
- FORTALEZA, C. M. C. B. et al. Multi-state survey of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Brazil. *Journal of Hospital Infection*, v. 96, n. 2, p. 139-144, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.03.024>
- GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 73, p. 354-360, 2012.
- GOMINET, M. et al. Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017? *APMIS*, v. 125, p. 365-375, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/apm.12665>.
- GONTIJO FILHO, P. P. et al. Spread of Multidrug-resistant microorganisms: a global threat and critical healthcare problem. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, Santa Cruz do Sul, v. 6, n. 3, Jul. 2016. ISSN 2238-3360. <http://dx.doi.org/10.17058/reci.v6i3.7062>
- GONÇALVES, I. R. et al. Outbreaks of colistin-resistant and colistin-susceptible KPC producing *Klebsiella pneumoniae* in a Brazilian intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, v. 94, n. 4, p. 322-329, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.08.019>
- HAN, X. et al. Clinical and laboratory insights into the threat of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 64, n. 3, p. 107275, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2024.107275>
- HENDRIKSEN, R. S. et al. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nature Communications*, v. 10, Mar. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08853-3>

HU, Q. et al. Características clínicas, eficácia e custo de diferentes métodos de tratamento para pneumonia invasiva por *Klebsiella* e síndrome do abscesso hepático. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, v. 49, n. 5, p. 748-757, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2024.240063>

HU, F. et al. Tipos capsulares de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos, resistência a antibióticos e fatores de virulência na China: um estudo longitudinal e multicêntrico. *Nature Microbiology*, v. 9, p. 814-829, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41564-024-01612-1>

HUSNA, A. et al. Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL): Challenges and Opportunities. *Biomedicines*, v. 11, n. 11, p. 2937, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11112937>

HYUN, M.; LEE, J. Y.; KIM, H. A. Análise Clínica e Microbiológica da Infecção por *Klebsiella pneumoniae*: Hiper mucoviscosidade, Fator de Virulência, Genótipo e Suscetibilidade Antimicrobiana. *Diagnostics*, v. 14, n. 8, p. 792, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/diagnostics14080792>

ISOGAI, M. et al. Avaliação da patogenicidade de *Klebsiella pneumoniae* por meio da análise holística do conteúdo gênico. *Microbial Genomics*, v. 10, n. 9, p. 001295, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001295>

IREDELL, J.; BROWN, J.; TAGG, K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. **BMJ**, h6420, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj.h6420>.

JIANG, M. et al. Diferenças nas características moleculares e expressão de genes de virulência em isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes e sensíveis a carbapenêmicos em Ningbo, China. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, p. 1356229, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1356229>

JOHANSEN, H. K. et al. Spread of colistin-resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*, v. 7, n. 5, p. 391-397, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2008.02.003>

KOLLEF, M. H. et al. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest*, Chicago, v. 115, n. 2, p. 462-474, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1378/chest.115.2.462>.

LANKS, C.W.; MUSANI, A.I.; HSIA, D.W. Community-acquired Pneumonia and Hospital acquired Pneumonia. *Medical Clinics of North America*, v.103, p.487-501, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.12.008>

LEAL, H. F. et al. Bloodstream infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria: epidemiological, clinical and microbiological features. *BMC Infectious Diseases*, v. 19, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4265-z>

LI, D. et al. Monotherapy vs combination therapy in patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 30, n. 5, p. 372-378, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2024.02.007>

LI, Y. et al. Characteristics of antibiotic resistance mechanisms and genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Open Medicine*, v. 18, n. 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/med-2023-0707>

LIAO, Q. et al. Relationship between virulence and carbapenem resistance phenotype of *Klebsiella pneumoniae* from blood infection: identification of a carbapenem-resistant and hypervirulent strain. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, v. 53, n. 4, p. 490-497, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3724/zdxbyxb-2024-0104>.

LINCOPAN, N. et al. Enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Brazilian hospitals. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, p. 1611-1613, Nov. 2006. <https://doi:10.1099/jmm.0.46771-0>

LISBOA, T. et al. Prevalência de infecção nosocomial em unidades de terapia intensiva do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 19, n. 4, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-507X2007000400002>

LIVERMORE, D. M.; HAWKEY, P. M. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, n. 3, p. 451-454, 2005. <https://doi.org/10.1093/jac/dki239>

LÜ, Y. et al. A multi-center nested case-control study on hospitalization costs and length of stay due to healthcare-associated infection. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, v.7, p.99, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0386-1>

MA, J. et al. Características epidemiológicas e moleculares de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos de pacientes pediátricos em Henan, China. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 23, n. 98, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12941-024-00757-5>

MA L. C. et al. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 192, n.1, p.117–128, Jul. 2005. <https://doi.org/10.1086/430619>

MAMMINA, C. et al. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. *Euro Surveillance*, v. 17, p. 1-4, 2012. <https://doi.org/10.2807/es.e17.33.20248-en>

MASEDA, G. E. et al. Update on catheter-related bloodstream infections in ICU patients. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 29, n. 4, p. 10-15, 2011. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70031-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70031-3)

MIRBAG, H. H. et al. Comparação de fatores de virulência entre isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL e não ESBL. *Iranian Journal of Microbiology*, v. 16, n. 1, p. 39-48, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.18502/ijm.v16i1.14869>

MONTEIRO, J. et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 1, p. 333-4, Jan. 2009. <https://doi.org/10.1128/AAC.00736-08>

MONTEIRO, A. de S. S. et al. Virulence Factors in *Klebsiella pneumoniae*: A Literature Review. *Indian Journal of Microbiology*, v. 64, n. 2, p. 389-401, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12088-024-01247-0>.

MOREIRA, M. R. et al. Antimicrobial use, incidence, etiology and resistance patterns in bacteria causing ventilator-associated pneumonia in a clinical-surgical intensive care unit. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v. 46, n. 1, p. 39-44, 2013. <https://doi.org/10.1590/0037-868216722013>

MORGADO, S. et al. A genômica do complexo de espécies de *Klebsiella pneumoniae* revela a circulação de clones pandêmicos multirresistentes de alto risco em fontes humanas, animais e ambientais. *Microorganisms*, v. 10, n. 11, p. 2281, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112281>

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

NAKAMURA-SILVA, R. et al. Caracterização de cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes e virulentas pertencentes ao grupo clonal de alto risco 258 (CG258) isoladas de pacientes internados no nordeste do Brasil. *Archives of Microbiology*, v. 203, p. 4351-4359, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02425-0>

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, n. 9, p. 821-830, 2014. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12719>

OLIVEIRA, A. C. et al. Infecções relacionadas à assistência em saúde e gravidade clínica em uma unidade de terapia intensiva. *Revista Gaúcha de Enfermagem*, Porto Alegre, v. 33, n. 3, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1983-14472012000300012>

OMS. OMS atualiza lista de bactérias que mais ameaçam a saúde humana. *ONU News*, 17 maio 2024. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2024/05/1831781>.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 48, n. 6, p. 996-1001, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2007.07.007>

PAPP-WALLACE, K. M. et al. Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, n. 11, p. 4943-4960, 2011. <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-1>

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 6, p. 2702, 2009. <https://doi.org/10.1128/AAC.00089-09>

PEREIRA, J. L.; VOLCÃO, L. M.; KLAFKE, G. B.; VIEIRA, R. S.; GONÇALVES, C. V.; RAMIS, I. B.; DA SILVA, P. E. A.; VON GROLL, A. Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamases of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Isolates from Urinary Tract Infections in Southern Brazil. *Microbial Drug Resistance*, v. 25, n. 2, p. 173-181, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0046>

PEREZ, F.; VAN DUIN, D. Enterobacteriaceae resistente a carbapenêmicos: uma ameaça aos nossos pacientes mais vulneráveis. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 80, n. 4, p. 225-233, abr. 2013. DOI: 10.3949/ccjm.80a.12182. PMID: 23547093; PMCID: PMC3960994. Disponível em: <https://doi.org/10.3949/ccjm.80a.12182>.

PITOUT, J. D. et al. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum betalactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, n. 1, p. 52-9, Jul. 2005. <https://doi:10.1086/508877>

POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 30, n. 2, p. 557-596, Abr. 2017. <https://doi:10.1128/CMR.00064-16>

PORTO, A.M.P. et al. Global point prevalence survey of antimicrobial consumption in Brazilian hospitals. *Journal of Hospital Infection*, v.104, n.2, p.165-171, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.10.016>

POURMAND, A. et al. Emerging trends in antibiotic resistance: Implications for emergency medicine. *The American Journal of Emergency Medicine*, v. 35, n. 8, p. 1172-1176, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2017.03.010>

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, p. 440-458, 2007. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>

QUEM. Lista de patógenos bacterianos prioritários da OMS.2024. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>

QUINTEROS, M. et al. Extended-Spectrum β -Lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 9, p. 2864-2867, 2003. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2864-2867.2003>

RICHARDS, M.; THURSKY, K.; BUISING, K. Epidemiology, prevalence, and sites of infections in intensive care units. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, Nova Iorque, v. 24, n. 1, p. 3-22, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2003-37913>.

ROCHA, F. R.; PINTO, V. P.; BARBOSA, F. C. The Spread of CTX-M-Type Extended Spectrum β -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. *Microbial Drug Resistance*, v. 22, n. 4, p. 301-311, 2016. <https://doi:10.1089/mdr.2015.0180>

ROSENTHAL, V. D. et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report of health care associated infections, data summary of 45 countries for 2015 to 2020, adult and pediatric units, device-associated module. *American Journal of Infection Control*, v. 52, n. 9, p. 1002-1011, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2023.12.019>

RUSSO, T. A.; GULICK, A. M. Aerobactin Synthesis Proteins as Antivirulence Targets in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *ACS Infectious Diseases*, v. 5, n. 7, p. 1052-1054, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00117>

RUSSO, T. A.; MARR, C. M. *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 32, n. 3, p. e00001-19, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-19>

RUSSO, T. A. et al. Diferenciação de *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta e clássica com resistência adquirida a drogas. *mBio*, v. 15, n. 2, p. e02867-23, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mbio.02867-23>

SABATIER, C.; PEREDO, R.; VALLÉS, J. Bacterial bloodstream infections in critical patients. *Medicina Intensiva*, v. 33, n. 7, p. 336-345, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.medin.2008.08.001>.

SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 31-37, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.002>.

SILVA, E. et al. Prevalence and outcomes of infections in Brazilian ICUs: a subanalysis of EPIC II study. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 143-150, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-507X2012000200008>

STANTON, T. D.; WYRES, K. L. O que define *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta? *EBioMedicine*, v. 108, p. 105331, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.105331>

STÜKER, C. A. S. et al. Análise das infecções causadas por bactérias Gram negativas produtoras de carbapenemases em um hospital dos Campos Gerais. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 17, p. e227101724819, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i17.24819>

TAMMA, P. D.; RODRIGUEZ-BANO, J. The Use of Noncarbapenem β -Lactams for the Treatment of Extended-Spectrum β -Lactamase Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 2017 v. 1, n.64(7), p 972-980, Abr. 2017. <https://doi:10.1093/cid/cix034>

TAN, T. Y. et al. Hypermucoviscosity, rmpA, and aerobactin are associated with community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremic isolates causing liver abscess in Singapore. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 52, n. 1, p. 30-34, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.07.003>.

TANGCHAROENSATHIEN, V. et al. Complex determinants of inappropriate use of antibiotics. *Bull World Health Organ*, v. 1, n. 96(2), p. 141-144, 2018. <https://doi.org/10.2471/BLT.17.199687>

TUMBARELLO, M. et al. Resultados e preditores de mortalidade em pacientes com infecções por KPC-KP tratados com meropenem vaborbactam: um estudo multicêntrico observacional. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 11, n. 6, p. ofae273, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofae273>

VÁSQUEZ-PONCE, F. et al. Surgimento das variantes KPC-113 e KPC-114 em *Klebsiella pneumoniae* resistente à ceftazidima-avibactam pertencente aos clones de alto risco ST11 e ST16 na América do Sul. *Microbiology Spectrum*, v. 11, n. 5, p. e00374-23, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00374-23>

VILAR-COMPTE, D.; CAMACHO-ORTIZ, A.; PONCE-DE-LEÓN, S. Infection control in limited resources countries: Challenges and priorities. *Current Infectious Disease Reports*, Filadélfia, v. 19, n. 5, p. 20, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11908-017-0572-y>.

VILLEGAS, M. et al. Increasing prevalence of extended spectrum-betalactamase among Gram-negative bacilli in Latin America: 2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 15, n. 1, p. 34-39, Jan. 2011. [https://doi.org/10.1016/S1413-8670\(11\)70137-4](https://doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70137-4)

VINCENT, J. L. et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Journal of the American Medical Association*, Chicago, v. 302, n. 21, p. 2323-2329, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1754>

WANG, X. et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging Microbes & Infections*, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0124-z>

WILHELM, C. M. et al. Susceptibility evaluation of novel beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from bloodstream infections in hospitalized patients in Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 38, p. 247-251, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.06.007>.

YAN, J. J. et al. Extended-Spectrum β -Lactamases and Plasmid-Mediated AmpC Enzymes among Clinical Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Seven Medical Centers in Taiwan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 5, p. 1861-1864, 2006. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1861-1864.2006>

ZHU, J. et al. Dinâmica de transmissão e novos tratamentos de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos de alto risco: a lente de uma saúde. *Pharmaceuticals*, v. 17, n. 9, p. 1206, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph17091206>

Capítulo II

Dissemination of nosocomial ESBL- and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates

Dissemination of nosocomial ESBL- and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates

Original Article

Camila Peredo Ramirez¹; Elias Rodrigues de Almeida-Junior¹; Vitelhe Ferreira de Almeida¹; Vinícius Lopes Dias¹; Cristiane Silveira Brito¹; Monica Camargo Sopelete²; Rosineide Marques Ribas^{1*}

¹Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

²Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

***Corresponding author:**

Federal University of Uberlândia, Institute of Biomedical Sciences, Laboratory of Molecular Microbiology. Av. Pará, 1720, Umuarama, Uberlândia-MG. 38405-320. Brazil. Tel.: 55 034 3225 8574. E-mail: rosi_ribas@yahoo.com.br

Funding sources: National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Deceit/SECTICS/MS and Minas Gerais State Agency for Research and Development FAPEMIG/PPSUS, Foundation for the Coordination of Higher Education Personnel Improvement (CAPES).

SUMMARY

Introduction: The dissemination of *Klebsiella pneumoniae* resistant to carbapenems and broad-spectrum cephalosporins is a critical and concerning issue today.

Aim: We conducted an investigation to analyze the dissemination of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and carbapenemase-producing virulent *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates.

Methodology: Fifty-one *Klebsiella pneumoniae* isolates were randomly selected from two tertiary hospitals in Minas Gerais, Brazil in 2021. The isolates, which were resistant to carbapenems, were further explored for *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{VIM}, *qnrA*, *aadA1*, *entB*, *kfu*, *ureA*, *wabG*, *allS*, *Aero*, and *rmpA* genes using polymerase chain reaction (PCR). All the *bla*_{CTX-M-15} PCR amplicons were analyzed for genetic relationships by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).

Results: A high prevalence of resistance genes was detected in this study, including ESBLs genes: *bla*_{CTX-M-15} (25.5%), *bla*_{TEM} (96.1%), *bla*_{SHV} (92.2%), and carbapenemase genes *bla*_{KPC} (31.4%), *bla*_{VIM} (54.9%), *bla*_{NDM} (25.5%); also a high presence of virulence genes were detected as *entB* (84.3%), *kfu* (86.3%), *urea* (90.2%), *wabG* (94.1%), *allS* (11.8%), *aero* (68.6%) and *rmpA* (9.8%). Among all infections caused by *Klebsiella pneumoniae*, respiratory (32.7%) was the most common, followed by rectal colonization (24.7%). Twelve samples containing the *bla*_{CTX-M-15} gene were analyzed by PFGE, with 50.0% also carrying the *bla*_{KPC} gene. Genotyping revealed eight distinct PFGE profiles (A-G), with three dominant clones: A, B, and E. Clones A and E were found in the southeast region of the city, while clone B was present in the northern region. Most samples were from the respiratory tract, followed by rectal and urinary sources.

Conclusion: The present study provides important evidence of epidemiological and clinical interest, highlighting the high frequency of resistance and virulence genes in samples obtained from severe infections and colonization, the latter representing a significant reservoir of these genes. Cross-transmission of the strains was evident.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Tertiary Care Centers, Virulence, Brazil.

1. Introduction

Klebsiella pneumoniae exhibits varied and complex antimicrobial resistance mechanisms and disseminating extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates, remain a major global threat. In this context, the dissemination of these phenotypes has been strongly influenced by the intensive and indiscriminate use of broad-spectrum cephalosporins and carbapenems, limiting the use of these antimicrobials in clinical practice [1-3].

So far, *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) is the most prevalent and widespread carbapenemase reported, having been extensively disseminated in healthcare environments globally, particularly among *K. pneumoniae* isolates [4,5]. However, studies conducted in Brazil have shown higher levels of distribution of ESBL genes, primarily *bla_{CTXM}* (64.0%) and *bla_{SHV}* (62.5%) [6,7], as well as carbapenemase genes, including *bla_{IMP}* (54.8%) and *bla_{KPC}* (55.6%), among *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from clinical samples [5,8,9]. In addition to these high rates, these genes are carried by mobile genetic elements and plasmids, facilitating transfer between microorganisms, and promoting rapid dissemination [6,10].

The present study aimed to analyze the dissemination of virulent *Klebsiella pneumoniae* isolates producing ESBL and carbapenemase in the hospital setting.

2. Methods

2.1 Bacterial Isolates and Hospital Setting

Fifty-one clinical strains were obtained from two public hospitals in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil in 2021. Strains identification was performed by each hospital using automated techniques (VITEK II bioMérieux and MALDI-TOF). The strains were sent to the Laboratory of Molecular Microbiology at the Institute of Biomedical Sciences

(ICBIM) in the University Federal of Uberlândia. All samples were inoculated with Agar Brain Heart Infusion (BHI) using the streak plate method to obtain pure cultures and subsequently stored in cryogenic tubes containing BHI broth added with 15% glycerol at -80°C for further microbiological and molecular evaluations.

2.2 DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction Amplification of Antibiotic Resistance Genes

DNA extraction was performed by thermal lysis following an optimized protocol. Briefly, bacterial samples were cultured in BHI broth overnight at 37°C. After growth, the samples were subjected to a heating bath at 100°C for 10 minutes to lyse the cells. After lysis, the samples were immediately cooled on ice for 10 minutes. A centrifugation at 20.000 xg for 1 minute was performed to remove cellular debris. The supernatant containing the DNA was carefully transferred to a new sterile tube. The DNA samples were stored at -20°C until further analysis.

The detection of virulence genes [3,11-15] and resistance [3,16-19,36] was evaluated using endpoint PCR. PCR reactions were performed with a final volume of 25µL, containing 12.5µL of PCR mix (GoTaq® Green Master Mix, Promega), 10µL of ultrapure water, 1 µL (10 ng) of total DNA, and 0.75µL of each primer. The target genes, primers used, and specific annealing temperatures for each PCR are shown in **Table I**. The thermal cycling conditions included an initial denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by 30 cycles of 95°C for 1 minute, specific annealing temperature for 1 minute, and 72°C for 1 minute, with a final extension at 72°C for 5 minutes. Amplified products were separated on a 2% agarose gel and visualized under ultraviolet light.

2.3 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

All 12 strains of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with *bla*_{CTXM-15} genotypes were selected as representatives from the study and were subjected to PFGE typing. PFGE was performed to determine the genetic relatedness between the isolates.

XbaI-digested genomic DNA was prepared, and DNA fragments were used for electrophoresis, performed in the CHEF-DR III ® device (BioRad), in TBE [0.5x] at 12°C and a voltage of 6V/cm for 21 hours. The pulses were programmed from 5 to 40 seconds with an angle of 120°. Finally, the gel was stained with 20 µL of ethidium bromide in 200 mL of TBE buffer [0.5x] for 40 minutes, visualized using a transilluminator, and photographed using the L-Pix EX photo documentation system (Loccus Biotecnologia®). Band patterns were analyzed through visual comparison between samples and the GelAnalyzer 19.1 using the Dice similarity coefficient and the Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) for cluster analysis. A dendrogram was constructed utilizing the Dice method (http://insilico.ehu.eus/dice_upgma/), and clustering was performed using the unweighted-pair group method with average links, employing a 1% band and position tolerance. A similarity coefficient of 85% was selected to define clusters.

3. Results

Among the 51 *K. pneumoniae* strains, the main source was the rectum 17/51 (33.3%), followed by the lung 15/51 (29.4%), blood 10/51 (19.7%), urinary tract 8/51 (15.7%), and other sources 1/51 (1.9%). Of the isolates, 51% were recovered from the southeast region and 49% from the northern region of Uberlândia city, Minas Gerais, Brazil.

The resistance and virulence genes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* are presented in **Figure 1**. PCR was performed to assess important virulence genes, including *entB* 43/51 (84.3%), *kfu* 44/51 (86.3%), *ureA* 46/51 (90.2%), *wabG* 48/51 (94.1%), *allS* 6/51 (11.8%), *aero* 35/51 (68.6%), and *rmpA* 5/51 (9.8%). Resistance

genes were also identified, including ESBLs (71.2%), with *bla*_{CTX-M-15} 15/51(25.5%), *bla*_{TEM} 49/51 (96.1%), and *bla*_{SHV} 47/51(92.2%), as well as carbapenemase genes (98.1%). In summary, among the carbapenemase genes, 31.4% (16/51) harbored *bla*_{KPC}, 54.9% (28/51) *bla*_{VIM}, and 25.5% (13/51) *bla*_{NDM}. Emphasizing that the isolates, which were resistant to carbapenems.

Figure 2 demonstrates bacterial infection rates in 2021 involving *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, and *bla*_{CTX-M-15} genes. Respiratory infections were the most common (32.7%), followed by rectal colonization (24.7%), urinary infections (16.7%), bloodstream infections (14,0%), and other infections (12,0%). The most prevalent infection associated with the *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{KPC} genes was respiratory (37,0% and 38,0% respectively). In the case of patients with samples carrying the *bla*_{NDM} gene, colonization was predominant (31,0%).

Twelve samples containing the *bla*_{CTX-M-15} gene were analyzed by PFGE, of which 50% harbored the *bla*_{KPC} gene. Genotyping of the samples revealed 8 distinct PFGE profiles (A-G), with 3 dominant clones: A, B, and E. Clones A and E were found only in the southeast region of the city and clone B in the northern region. Most clone samples were from respiratory sources, followed by rectal and urinary tract (**Figure 3**).

4. Discussion

Antimicrobial resistance in *K. pneumoniae* with additional virulence factors has been recognized as a serious public health concern worldwide [20]. Its epidemiology, particularly concerning resistance, is complex and not restricted to humans [3,21]. In Brazil, previous studies have investigated the occurrence of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates in intensive care units, with a particular focus on the production of KPC as the main mechanism of resistance [2]. Additionally, the presence of *bla*_{CTX-M-15},

which encodes ESBL (Extended-Spectrum Beta-Lactamase), has become common and worrisome among these strains [3,22]. Further worsening this scenario, our findings also reveal that 40,2% of these strains presented other carbapenems resistance genes such as *bla_{NDM}* and *bla_{VIM}*. Another highlight is the percentage of samples containing genes for resistance to fluoroquinolones (43,1%) and aminoglycosides (92,2%). These frequencies are similar to those found in other studies [23,24].

Studies have shown that plasmids containing genes like *bla_{KPC}* are not always linked to increased virulence [25]. Despite this, the samples analyzed in this study had multiple virulence genes (*entB*, *kfu*, *ureA*, *wabG*, *allS*, *Aero*, and *rmpA*). Recent research has demonstrated that these genes in *K. pneumoniae* (mainly capsular type, LPS, adhesins, and iron-scavenging systems) can enhance the virulence potential of microorganisms and contribute to developing more invasive diseases [20,26].

Unfortunately, in the present study, the presence of these genotypes in clinically derived *K. pneumoniae* was frequent and alarmingly high, and strains carrying the *bla_{KPC}* gene have become increasingly common [2,26,27], as observed in this study. The concern arises from genes found in plasmids, allowing for the rapid and widespread dissemination of these microorganisms, with a significant proportion of strains containing the *bla_{NDM}* gene, further worsening the situation [10,28,29]. These resistance mechanisms contribute to treatment failures and complicated management strategies, leading to increased morbidity and mortality among affected patients [4,16].

The distribution of infection sources reveals critical insights into the epidemiology of *K. pneumoniae* in the region. The rectum 17/51 (33.3%) and lungs 15/51 (29.4%) were key sources, although pulmonary episodes (32.7%) presented the highest levels of resistance genes, such as *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}* and *bla_{CTX-M-15}*, in this study. This highlights the

importance of these sites in the transmission and establishment of infections, the latter raising mortality and morbidity [4,30-32].

The predominance of respiratory infections among patients carrying the *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{KPC} genes 6/16 [37% (5/13) and 38% (6/16) for each one] as well as several other resistance and virulence factors indicates a potential correlation between the presence of these resistance genes and the severity of respiratory illnesses [33]. Furthermore, the substantial rate of colonization 4/13 (31%) among samples with the *bla*_{NDM} gene emphasizes the need for heightened surveillance and infection control measures in healthcare settings [29]. Colonization can serve as a reservoir for subsequent infections, including those with resistance genes, as evidenced by the study, exacerbating the challenge of managing severe multidrug-resistant *K. pneumoniae* infections in clinical environments [31].

Notably, the PFGE analysis identified multiple clones linked to infection and colonization from various sources across different hospital units. Geographic variation in the distribution of these clones was also notable, with distinct PFGE profiles observed. Clones A and E were restricted to the southeast region, while clone B was identified in the northern region of Uberlândia. Many of these clones originated from respiratory samples, followed by rectal and urinary sources, suggesting localized transmission dynamics that warrant further investigation. Identification of dominant clones may assist in understanding epidemiological trends and guiding public health interventions [6]. The dissemination of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* clones has become a major concern, especially in intensive care units [2,23,34]. Data from studies show a notable prevalence of hyperendemic clones in different regions of the country, leading to an increase in outbreaks caused by strains extremely resistant to multiple antibiotics [4,5,16,35].

5. Conclusions

In conclusion, the results of this study provide evidence of a concerning scenario regarding the clonal dissemination of *K. pneumoniae* in intensive care units, as they show the alarming presence of plasmid-encoded genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, and *bla_{CTX-M-15}* as well as multiple virulence genes in clinically significant clones associated with severe infections.

Competing interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We acknowledge all the management of the invited hospitals that consented to participate in this study, and the staff members for their collaboration.

Funding information

This work was supported by public agencies dedicated to the promotion of scientific and technological research: Minas Gerais State Agency for Research and Development FAPEMIG/PPSUS, DECIT/SCTIE/MS, SES/MG and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Ethical statement

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, and ethical approval was granted under protocol number 239/11. Verbal and written consent were obtained from each hospital representative and from all individuals to participate in the study. At all stages of the study, the principles of confidentiality and non- maleficence were applied, and the hospitals and patients identities were kept confidential.

6. References

1. Li Y, Kumar S, Zhang L, Wu H, Wu H. Characteristics of antibiotic resistance mechanisms and genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Open Med*. 2023;18(1):20230707. <https://doi.org/10.1515/med-2023-0707>
2. Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis*. 2011;52(9):1138–43. <https://doi.org/10.1093/cid/cir120>
3. Husna A, Rahman MM, Badruzzaman ATM, Sikder MH, Islam MR, Rahman MT, et al. Extended-spectrum-lactamases (ESBL): challenges and opportunities. *Biomedicines*. 2023; 11:2937. <https://doi.org/10.3390/biomedicines1112937>
4. Campos PA. Dissemination of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: biofilm production, evaluation of virulence and bacterial fitness in clinical samples producing KPC [thesis]. Uberlândia: Federal University of Uberlândia; 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2017.72>
5. Lan P, Jiang Y, Zhou J, Yu Y. A global perspective on the convergence of hypervirulence and carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021; 25:26–34. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.02.020>
6. Cabral AB, Melo RC, Maciel MA, Lopes AC. Multidrug resistance genes, including bla(KPC) and bla(CTX)-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(5):572–8. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822012000500007>
7. Seki LM, Pereira PS, Conceição MS, Souza MJ, Marques EA, Carballido JM, et al. Molecular epidemiology of CTX-M producing Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. *Braz J Infect Dis*. 2013;17(6):640–6. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.03.012>
8. Mendes RE, Castanheira M, Pignatari ACC, Gales AC. Metallo-beta-lactamases. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42(2):103–13. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442006000200007>
9. Vivan ACP, Rosa JF, Rizek CF, Pelisson M, Costa SF, Hungria M, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from a university hospital in Brazil. *J Infect Dev Ctries*. 2017;11(5):379–86. <https://doi.org/10.3855/jidc.8614>
10. Quezada-Aguiluz M, Opazo-Capurro A, Lincopan N, Esposito F, Fuga B, Montecino SM, et al. Novel megaplasmid driving NDM-1-mediated carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* ST1588 in South America. *Antibiotics*. 2022; 11:1207. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091207>
11. Tan TY, Ong M, Cheng Y, Ng LS. Hypermucoviscosity, rmpA, and aerobactin are associated with community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremic isolates causing liver abscess in Singapore. *J Microbiol Immunol Infect*. 2019;52(1):30–4. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.07.003>
12. Sundsfjord A, Simonsen GS, Haldorsen BC, Haaheim H, Hjelmvoll SO, Littauer P, et al. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance.

- APMIS. 2004; 112:815–37. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2004.apm11211-1208.x>
13. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Lai CC, Chuang YC. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62(1):1–6. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.007>
 14. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One*. 2009;4:e4982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004982>
 15. Compain F, Babosan A, Brisse S, Genel N, Audo J, Ailloud F, et al. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2014;52(12):4377–80. <https://doi.org/10.1128/JCM.02316-14>
 16. Ranjbar R, Memariani H, Sorouri R. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from children with urinary tract infections. *Arch Pediatr Infect Dis*. 2017;5(2):e39000. <https://doi.org/10.5812/pedinfect.39000>
 17. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011; 70:119–23. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
 18. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Hye Park C, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med*. 2006; 12:83–8. <https://doi.org/10.1038/nm1347>
 19. Schlesinger J, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Hammer-Münz O, Leavitt A, Gold HS, et al. Extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacter* isolates obtained in Tel Aviv, Israel. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(3):1150–6. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.3.1150-1156.2005>
 20. Maleki NS, Babazadeh F, Arzanlou M, Teimourpour R, Dogaheh HP. Serotyping and molecular profiles of virulence-associated genes among *Klebsiella pneumoniae* isolates from teaching hospitals of Ardabil, Iran: A cross-sectional study. *Health Sci Rep*. 2023;6(9):e1557. <https://doi.org/10.1002/hsr2.1557>
 21. Russo TA, Gulick AM. Aerobactin synthesis proteins as antivirulence targets in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *ACS Infect Dis*. 2019;5(7):1052–4. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00117>
 22. Tollentino FM, Polotto M, Nogueira ML, Lincopan N, Neves P, Mamizuka EM, et al. High prevalence of bla (CTX-M) extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of bla(SHV-12), bla(SHV-31), bla(SHV-38), and bla(CTX-M-15) in Brazil. *Microb Drug Resist*. 2011;17(1):7–16. <https://doi.org/10.1089/mdr.2010.0055>
 23. Córdova-Espinoza MG, Giono-Cerezo S, Sierra-Atanacio EG, Escamilla-Gutiérrez A, Carrillo-Tapia E, Carrillo-Vázquez LI, et al. Isolation and identification of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones from the

- hospital environment. *Pathogens*. 2023;12:634. <https://doi.org/10.3390/pathogens12050634>
24. Ashrafián F, Fallah F, Hashemi A, Erfanimanesh S, Amraei S, Tarashi S. First detection of 16S rRNA methylase and blaCTX-M-15 genes among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Iran. *Res Mol Med*. 2015; 3:1-7. <http://dx.doi.org/10.7558/rmm.2015.04.005>
 25. Russo TA, Olson R, Fang CT, Stoesser N, Miller M, MacDonald U, Hutson A, Barker JH, La Hoz RM, Johnson JR. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2018;56(9). <https://doi.org/10.1128/JCM.00776-18>
 26. Araújo BF, Ferreira ML, Campos PA, Royer S, Gonçalves IR, da Fonseca Batistão DW, et al. Hypervirulence and biofilm production in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil. *J Med Microbiol*. 2018;67(4):523–8. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000711>
 27. Krul D, Rodrigues LS, Siqueira AC, Mesa D, Dos Santos ÉM, Vasconcelos TM, Spalanzani RN, Cardoso R, Ricieri MC, de Araújo Motta F, Conte D, Dalla-Costa LM. High-risk clones of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* recovered from pediatric patients in Southern Brazil. *Braz J Microbiol*. 2024;55(2):1437-1443. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01299-w>
 28. Gonçalves IR, Campos PA, Ferreira ML, Royer S, Machado LG, Araújo BF, et al. First case of New Delhi metallo- β -lactamase-1 of the same pulsotype of multi-drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Minas Gerais, Brazil. *J Hosp Infect*. 2018;99(4):431–2. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.04.016>
 29. Sampaio JL, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol*. 2016;47(Suppl 1):31–7. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.002>
 30. Ferreira ML. Molecular study of high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* producing carbapenemase of the KPC type resistant to colistin [thesis]. Uberlândia: Federal University of Uberlândia; 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2237>
 31. Vásquez-Ponce F, Bispo J, Becerra J, Fontana H, Pariona JGM, Esposito F, et al. Emergence of KPC-113 and KPC-114 variants in ceftazidime-avibactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* belonging to high-risk clones ST11 and ST16 in South America. *Microbiol Spectr*. 2023;11: e00374-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00374-23>
 32. Almeida Junior ER, Braga IA, Filho PPG, Ribas RM. Multicentre surveillance of epidemiologically important pathogens causing nosocomial bloodstream infections and pneumonia trials in Brazilian adult intensive care units. *J Med Microbiol*. 2023;72(2). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001654>
 33. Kocsis B. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: An update on epidemiology, detection and antibiotic resistance. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2023;70(4):278–87. <https://doi.org/10.1556/030.2023.02186>
 34. Braga IA, Campos PA, Batistão DWF, Gontijo Filho PP, Ribas RM. Using point prevalence survey to define burden of antimicrobial use among 35 adult

- intensive care units in Brazil. *Infect Dis (Lond)*. 2019;51(6):459–62.
<https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1581371>
35. Abrar S, Vajeeha A, Ul-Ain N, Riaz S. Distribution of CTX-M group I and group III β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Lahore, Pakistan. *Microb Pathog*. 2017; 103:8–12.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.12.004>
36. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, et al. Analysis of Antibiotic Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Acinetobacter* sp. Isolates from Military and Civilian Patients Treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:4114–23. <https://doi.org/10.1128/AAC.00778-06>

Table 1. Primers used for amplification of resistance and virulence from *Klebsiella pneumoniae*

Genes groups targeted	Primer	Sequence	Gene	Pb	Annealing temperature	Reference
Carbapenemase genes	KPC-F	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	<i>bla_{KPC}</i>	798	55°C	[17]
	KPC-R	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG				
	VIM-F	GATGGTGTGTTGGTCGCATA	<i>bla_{VIM}</i>	390	55°C	[17]
	VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG				
β -lactamase gene	NDM-F	GGTTTGCGCATCTGGTTTTTC	<i>bla_{NDM}</i>	621	55°C	[17]
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC				
ESBLs genes	TEM-F	ATGAGTATTCAACAT TTCCG	<i>bla_{TEM}</i>	858	50°C	[12]
	TEM-R	CTGACAGTTACCAATGCTTA				
	SHV-F	TTTATCGGCCYTCACCTCAAGG	<i>bla_{SHV}</i>	896	50°C	[19]
	SHV-R	GCTGCGGGCCGATAACG				
Quinolone gene	CTXM-15 -F	CACACGTGGAATTTAGGGACT	<i>bla_{CTXM-15}</i>	996	48°C	[16]
	CTXM-15-R	GCCGTCTAAGGCGATAAACA				
	qnrA-F	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	<i>qnrA</i>	627	50°C	[18]
	qnrA-R	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA				
Aminoglycoside gene	aadA1-F	ATGAGGGAAGCGGTGATCG	<i>aadA1</i>	792	55°C	[36]
	aadA1-R	TTATTTGCCGACTACCTTGGTG				
Virulence genes	entB-F	GTCAACTGGGCCTTTGAGCCGTC	<i>entB</i>	400	57°C	[15]
	entB-R	TATGGGCGTAAACGCCGGTGAT				
	kfu-F	GGCCTTTGTCCAGAGCTACG	<i>kfu</i>	638	57°C	[15]
	kfu-R	GGGTCTGGCGCAGAGTATGC				
	allS-F	CATTACGCACCTTTGTCAGC	<i>allS</i>	764	55°C	[15]
	allS-R	GAATGTGTGCGGATCAGCTT				
	wabG-F	CGGACTGGCAGATCCATATC	<i>wabG</i>	683	55°C	[14]
	wabG-R	ACCATCGGCCATTTGATAGA				
	ureA-F	GCTGACTTAAGAGAACGTTATG	<i>ureA</i>	337	57°C	[14]
	ureA-R	GATCATGGCGCTACCT(C/T)A				
	Aero-F	GCATAGGCGGATACGAACAT	<i>Aero</i>	556	48°C	[13]
	Aero-R	CACAGGGCAATTGCTTACCT				
	rpmA-F	CATAAGAGTATTGGTTGACAG	<i>rpmA</i>	461	49°C	[11]
	rpmA-R	CTTGCAATGAGCCATCTTTCA				

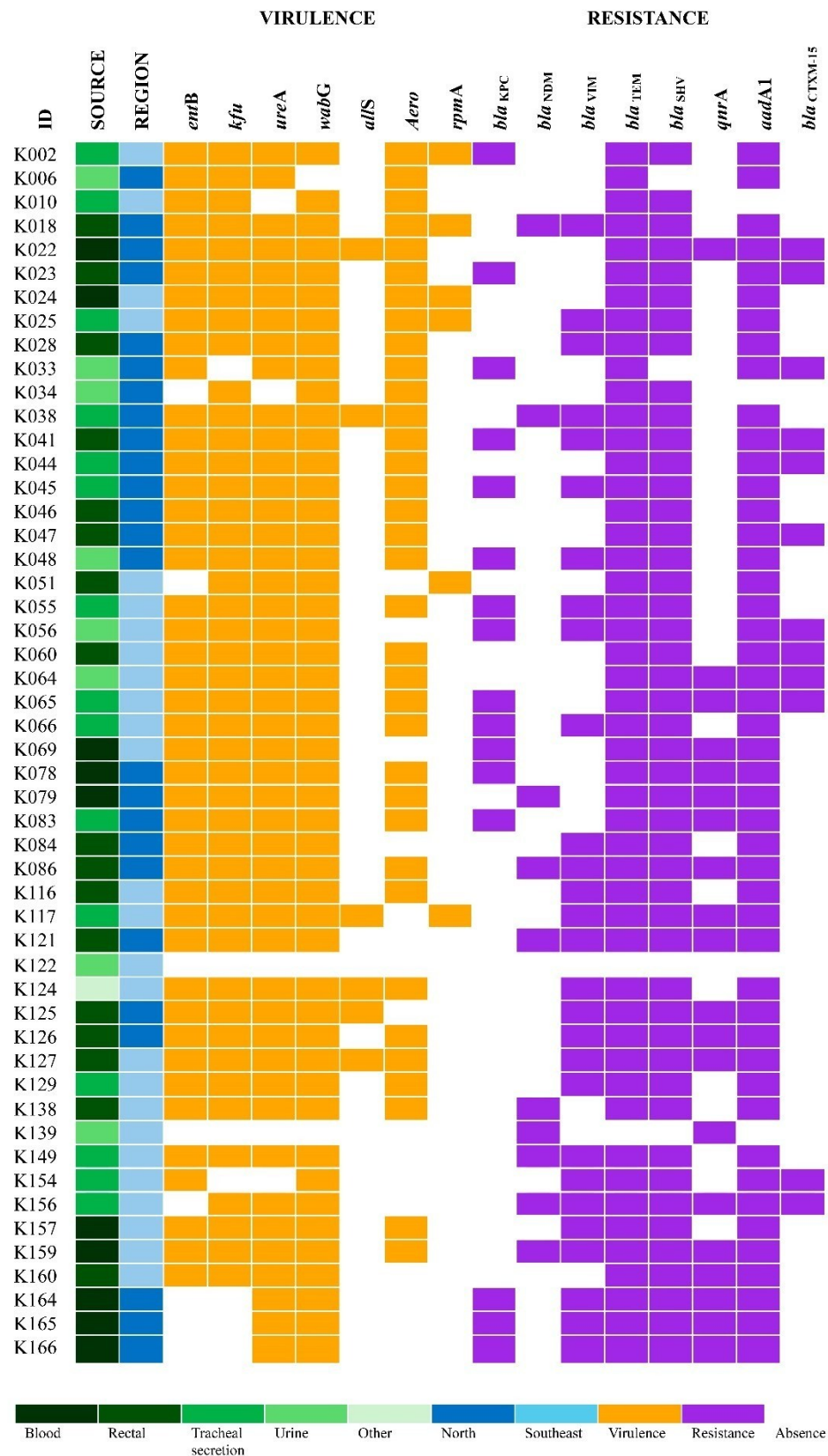


Figure 1. Heatmap displaying resistance and virulence of *Klebsiella pneumoniae* strains considering region, source, virulence and resistant genes, while blank fragments represent absence

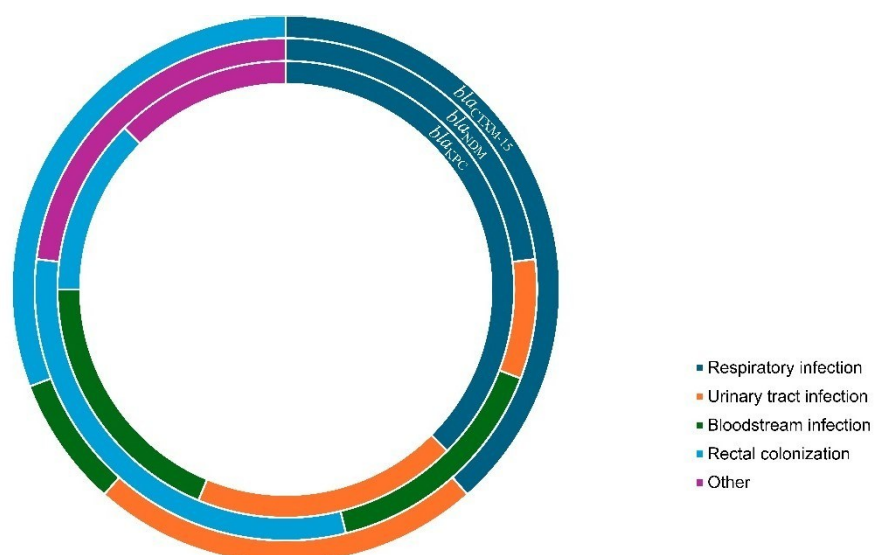


Figure 2. Distribution of bacteremia infections in patients with *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} and *bla*_{CTX-M-15} positive strains

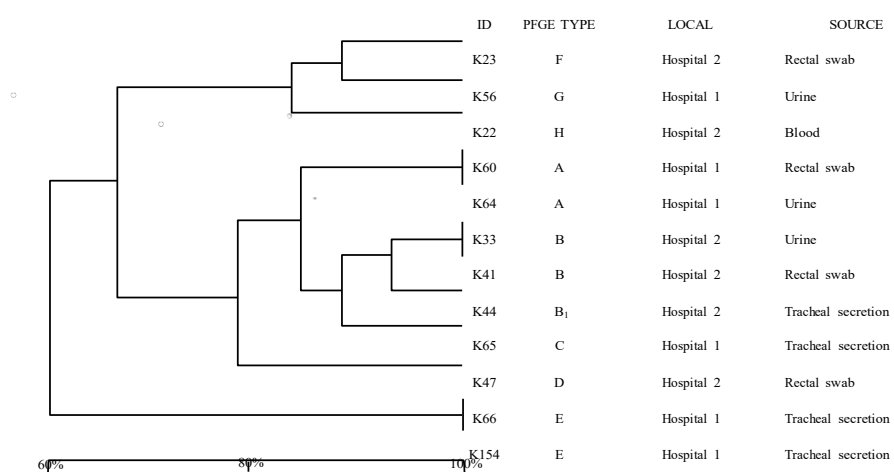


Figure 3. Dendrogram depicting the analysis of Pulsed- Field Gel Electrophoresis, pulsotypes, lineages and sources in *Klebsiella pneumoniae*

Capítulo III

Mortality Associated with Bacteremia Caused by Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: The Crucial Role of Therapy in Clinical Outcome

Mortality Associated with Bacteremia Caused by Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: The Crucial Role of Therapy in Clinical Outcome

Original Article

Camila Peredo Ramirez¹; Elias Rodrigues de Almeida-Junior¹; Vitelhe Ferreira de Almeida¹; Vinícius Lopes Dias¹; Cristiane Silveira Brito¹; Rosineide Marques Ribas^{1*}

¹Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

***Corresponding author:**

Federal University of Uberlândia, Institute of Biomedical Sciences, Laboratory of Molecular Microbiology. Av. Pará, 1720, Umuarama, Uberlândia-MG. 38405-320. Brazil. Tel.: 55 034 3225 8574.

E-mail: camila.ramirez@ufu.br

Funding sources: National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Deceit/SECTICS/MS and Minas Gerais State Agency for Research and Development FAPEMIG/PPSUS, Foundation for the Coordination of Higher Education Personnel Improvement (CAPES).

ABSTRACT

Background: We aimed to identify factors associated with mortality from *Klebsiella pneumoniae* bacteremia, focusing on the impact of targeted combination therapy.

Methods: We reviewed the medical records of a cohort of 109 patients (recovered during the period from 2012 to 2018) to assess the risk factors for carbapenem-resistant *K. pneumoniae* bacteremia. The relationship between the patient's demographic and clinical data and multi-drug resistance (MDR) was analyzed. The primary outcome was 30 days of mortality, and univariable analysis was performed to identify associated factors.. Excess mortality was calculated in the following groups: multidrug-resistant *K. pneumoniae*, carbapenem-resistant *K. pneumoniae*, and carbapenem-susceptible *K. pneumoniae*.

Results: Of the 109 *K. pneumoniae* isolates, 64.2% were carbapenem-resistant, and all patients received empirical antimicrobial therapy. Monotherapy was used in 20.2% of patients, while combination therapy was more common and associated with longer ICU stays and higher rates of primary bacteremia. Based on the antimicrobial susceptibility test and the initiation of treatment within 24 hours of diagnosis, empirical therapy was classified as inappropriate in 62.4% of total patients and 40.9% and 36.8% of patients with monotherapy and combination therapy, respectively. Hemodialysis catheter use was a key risk factor ($p=0.0238$). Mortality was highest in patients treated with third- and fourth-generation cephalosporins, and combination therapy alone did not significantly reduce mortality, which exceeded 45.9 %. Kaplan-Meier analysis showed no mortality reduction with combination therapy alone, though monotherapy was associated with higher mortality in multidrug-resistant *K. pneumoniae* infections. Patients with carbapenem-resistant *K. pneumoniae* had the excess mortality (12.95%), while those with multidrug-resistant strains had the lowest (4.51%).

Conclusions: The prevalence of carbapenem resistance in blood culture isolates from patients with *K. pneumoniae* infections is unacceptably high. In patients with bacteremia, carbapenem resistance is associated with excess mortality. Our findings are important for hospitals, enabling them to advance prevention and control measures for these infections.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, carbapenem-resistant, MDR, mortality

1. Introduction:

Klebsiella pneumoniae is considered one of the main causes of hospital infections and is mentioned by the World Health Organization as a priority antimicrobial-resistant pathogen that requires new control strategies. (1,2) The emergence and global spread of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* have posed a major threat to public health, particularly in low- and middle-income countries such as Brazil, due to the difficulties in treating these infections and the high associated mortality (3-5).

In Brazil, the estimated incidence rate of Carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (CRKP) bacteremia was increased from 43.4% to 56.3% in a region of Brazil (6,7), and the reported mortality rate of CRKP varied widely from 53.10 % to 83% in most studies (8,9). Thus, it is a fact that accurate diagnosis and management of bloodstream infections (BSIs), along with the application of appropriate antimicrobial therapy, can significantly improve patient survival rates.

It is important to emphasize that surveillance studies should be continuously conducted to better understand the epidemiology of these pathogens at the regional level. In this context, the increasing prevalence of CRKP complicates the empirical treatment of these infections, and healthcare institutions must adapt prevention and control measures to each region.

Objectives: We aimed to identify the variables associated with mortality in *K. pneumoniae* bacteremia, with particular attention given to the impact of targeted combination therapy.

2. Methods

2.1 Study design and data collection

This was a retrospective cohort study of BSI caused by *K. pneumoniae* in adult patients admitted to the ICU of a teaching referral hospital in Brazil between 2011 and 2019. This study was conducted using the bacteremia registry of the Microbiology laboratory of the Hospital. Only patients who were hospitalized in the Unit for at least 48 hours before the bacteremia diagnostic were eligible. This study was employed to identify the predictors of mortality and to evaluate the clinical consequence of resistance and the impact of inappropriate therapy. The main outcome was in-hospital mortality in 30 days. The information collected was recorded in the hospital and included demographics and clinical characteristics (illness severity, comorbidities), invasive devices, length of total

hospital stay, length of ICU stay, and invasive procedures. The medical history of the patient's underlying conditions, such as heart failure, nephropathy, malignancy, diabetes mellitus, chronic lung disease, and vascular disease was also included. We also assessed the sources of bacteremia, treatment regimes, and cases of inappropriate antimicrobial treatment.

2.2 Identification and Antimicrobial Susceptibility

Microbial identification and antimicrobial susceptibility testing were performed on the Vitek-2 system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) in the hospital. Antibiotics tested included aminoglycosides (gentamicin, amikacin), carbapenems (imipenem, meropenem), cephalosporins (cefepime), fluoroquinolones (ciprofloxacin) and β -lactamase inhibitors (piperacillin-tazobactam). Susceptibilities were determined according to the standards of the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI 2011-2019).

2.3 Definitions

Bacteremia is defined as the presence of viable microorganisms in the bloodstream, confirmed by a positive blood culture(10). It is considered acquired in unit care intensive if the infection develops more than 48 hours after hospital admission and there is no clinical evidence of infection at the time of admission(10). The episodes were classified into 3 categories according to the causative pathogens: carbapenem-susceptible *K. pneumoniae*(CSKP), CRKP, and multidrug-resistant *K. pneumoniae*. Bacteremia is classified as primary when a recognized pathogen is isolated from one or more blood cultures and is not linked to an infection at another site. Secondary bacteremia occurs when a recognized pathogen isolated from one or more blood cultures is associated with an infection at another site. (10)

Multidrug resistance is defined as when the isolate is non-susceptible to at least one antimicrobial agent within three or more classes. (11)

Antimicrobial therapy was classified as empirical when initiated before the availability of antimicrobial susceptibility testing results (typically 48 to 72 hours after blood culture collection) and as definitive once susceptibility data were available. Empirical therapy was deemed appropriate if all the following criteria were satisfied: administration of at least one antimicrobial agent by clinical guidelines, in vitro susceptibility of the isolated pathogen to the administered agent, and initiation of the first

dose within 24 hours of blood culture collection. Empirical therapy failing to meet these criteria was considered inappropriate.

Excess mortality is the measure most frequently chosen to estimate deaths from some cause. (12)

2.4 Statistical analysis

Student's t-test was used to compare continuous variables and χ^2 or Fisher's exact test was used to compare categorical variables. A survival curve was constructed using the Kaplan–Meier method, and the log-rank test was used for comparisons between patients with inappropriate and appropriate therapy, patients for source of infection, and patients in groups of therapy (monotherapy and combination therapy). All P values were two-tailed and $P \leq 0.05$ was considered to be statistically significant. The analyses were carried out using the GraphPad Prism software package (La Jolla, CA, EUA).

The excess number of deaths associated with BSIs caused by multidrug-resistant *K. pneumoniae*, carbapenem-resistant *K. pneumoniae*, and carbapenem-susceptible *K. pneumoniae* were then calculated for each group, using an Equation, derived from Bender and Blettner (Figure 3).

3. Results

Of the 109 *K. pneumoniae* isolates, 64.2% were resistant to carbapenems. All patients received empirical therapy with anti-Gram-negative antibiotics, either as monotherapy or in combination, administered at currently recommended doses. Based on the antimicrobial susceptibility test and the initiation of treatment within 24 hours of diagnosis, empirical therapy was classified as inappropriate in 62.4% of total patients and 40.9% and 36.8% of patients with monotherapy and combination therapy, respectively.

The definitive treatment regimen was designed based on the results of the antimicrobial susceptibility test and determined by the responsible physician. 20.2% of the patients received monotherapy. The comparison between these patients and those who received combination therapy revealed a longer ICU stay and a higher frequency of primary bacteremia in the latter group. The 30-day mortality rate was high, at 41.3%, with 27.3% in the monotherapy group and 44.8% in the combination therapy group, according to **Table I**. Regarding the underlying conditions, most presented at least one of these such as heart failure (45.0%), diabetes mellitus (17.4%), and nephropathy (15.6%). Primary

infection and lung infection were the most frequent sources of infection (51.4% and 33.0% respectively).

The association between different treatment regimens and crude 30-day mortality is shown in **Table II**. Mortality was particularly notable in patients treated with third- and fourth-generation cephalosporins in monotherapy, reaching 28.6 % for carbapenems. Combination therapy, on its own, was not associated with a reduction in mortality, showing mortality rates exceeding 45.6%.

The main characteristics of the survivor and non-survivor subgroups are presented in **Table III**, where according to the univariate analysis, the main risk factor was using a hemodialysis catheter ($p=0.0238$). Compared with survivors, non-survivors were older, more frequently cared for in the ICU, were more likely to be affected by comorbidities, more commonly had primary bacteremia, and less frequently had urinary tract as the source of infection. They also less frequently received the appropriate antibiotic therapy within 24 hours of primary infection.

The Kaplan-Meier curves for targeted treatment with monotherapy or with combination therapy are presented in **Figure 1A**, where combination therapy was not associated with decreased mortality by itself. The mortality is higher in the monotherapy group associated with infection for multidrug-resistant *K. pneumoniae* (**Figure 1B**). The Kaplan-Meier curves for targeted treatment with monotherapy or with combination therapy in patients with and without appropriate empirical therapy are presented in Figure 1C, which depict that patients with appropriate therapy have lower mortality than patients with inappropriate antibiotic therapy.

The lowest attributable mortality was found in patients with multidrug-resistant *K. pneumoniae* (4.51%), while the highest was found in those with *K. pneumoniae* carbapenem-resistant (12.95%). (**Figure 2**)

4. Discussion

Our study emphasizes the correlation between the CRKP and CSKP and the outcomes of patients with BSI and provides important insights into both monotherapy and combination therapy for these infections. Over the past 10 years, several

observational studies and meta-analyses of aggregated data have highlighted higher mortality in patients with CRKP BSI compared to those with CSKP BSI (3,5,9,13).

The increasing prevalence of severe carbapenem *K. pneumoniae* (KPC) infections, with high mortality rates, highlights the urgent need for effective treatments and is a healthcare concern, especially in low- and middle-income countries like Brazil. The literature supports this, highlighting the high prevalence of this phenotype in Brazilian hospitals with rates ranging from 63% to 96% (6,14,15).

The overall mortality in our patients was high (42.2%), similar to that observed in other studies(5,6,8,9), likely reflecting the severity of patients with BSI. Survival analysis revealed that (62.2%) of deaths occurred within 30 days of KP-BSI onset and received inappropriate therapy.

In our cohort, timely and appropriate antibiotic therapy was possibly associated with a reduced mortality risk. The interval between the onset of BSI and the start of appropriate antibiotic treatment has been linked to better outcomes in patients with CRKP infections.(2,10,12) It is worth noting that while we assessed the impact of inappropriate antimicrobial therapy, we did not investigate the effects of specific antibiotic regimens on patient outcomes. Thus, further studies are needed to explore the results of patients receiving different empiric antibiotics with demonstrated in vitro activity.

In this way, the 30-day crude mortality rate among patients with CRKP BSI was 45.9%, a figure similar to those reported in other countries and considerably higher than the 33.3% observed in patients with CSKP(9,16,17). Additionally, we estimated the attributable mortality for three types of *K. pneumoniae* isolates:multidrug-resistant *K. pneumoniae*, CRKP, and CSKP, in a group of patients with bacteremia. Attributable mortality ranged from 12.95% in CRKP patients to an unexpected -10.43% in those with CSKP bacteremia, suggesting that treatment is more efficient in these infections.

Our study was conducted in Brazil, a country with a high incidence of CRKP. Regional data on CRKP are of great importance, as they provide valuable information about these strains, allowing for a deeper understanding of the regional impact of these infections.(4,5,9) In this way, our data may reflect what occurs in countries with similar characteristics, but they cannot be generalized to countries with a low prevalence of resistant *K. pneumoniae*. However, the Brazilian experience is crucial for other countries to understand the impact of this phenotype on mortality and clinical practice.

Although no direct impact on mortality was observed, the presence of antibiotic-resistant pathogens increases the disease burden by replacing their antibiotic-susceptible counterparts and raising the overall number of infections. These infections can increase mortality in critically ill patients with comorbidities and generate additional costs due to increased healthcare exposure and the use of expensive antimicrobials, which may further be selected for antimicrobial-resistant pathogens. Therefore, early recognition and the implementation of effective control measures are essential to minimize the impact and mortality risk associated with CRKP BSI.

5. Conclusion

It is clear that bacteremia caused by CRKP are associated with high mortality rates, including excess mortality, representing a significant threat to critically ill patients. Although inappropriate empirical therapy was not statistically significant, it was associated with a higher early death rate compared to patients who received appropriate treatment.

Funding information

This work was supported by public agencies dedicated to the promotion of scientific and technological research: Minas Gerais State Agency for Research and Development FAPEMIG, Decit/SECTICS/MS – CNPq, CAPES.

Acknowledgments

The authors thank the management of the hospital invited that consented to participate in this study, as well as the staff members for their collaboration.

Ethical statement

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, and ethical approval was granted under protocol number 239/11. Verbal and written consent were obtained from each hospital representative and from all individuals to participate in the study. At all stages of the study, the principles of confidentiality and non-maleficence were applied, and the hospitals and patients identities were kept confidential.

6. References:

1. Falcone M, Tiseo G, Carbonara S, Marino A, Di Caprio G, Carretta A, et al. Mortality Attributable to Bloodstream Infections Caused by Different Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacilli: Results From a Nationwide Study in Italy (ALARICO Network). *Clin Infect Dis*. 2023;76(12):2059-69. <https://doi.org/10.1093/cid/ciad100>
2. Wang L, Zeng C, Li X, Li Y, Liu Z, Hu J. Mortality associated with carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: A propensity score-matched study. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2024;45(7):839-46. <https://doi.org/10.1017/ice.2024.21>
3. Wilhelm CM, Antochévis LC, Magagnin CM, Arns B, Vieceli T, Pereira DC, et al. Susceptibility evaluation of novel beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from bloodstream infections in hospitalized patients in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist*. 2024;38:247-51. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.06.007>
4. Sellera FP, Lincopan N, Fuentes-Castillo D, Stehling EG, Furlan JPR. Rapid evolution of pan- β -lactam resistance in Enterobacterales co-producing KPC and NDM: insights from global genomic analysis after the COVID-19 pandemic. *Lancet Microbe*. 2024;5(5):e412-e413. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(24\)00018-1](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(24)00018-1)
5. Krul D, Rodrigues LS, Siqueira AC, Mesa D, Santos ÉMD, Vasconcelos TM, et al. High-risk clones of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* recovered from pediatric patients in Southern Brazil. *Braz J Microbiol*. 2024;55(2):1437-43. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01299-w>
6. Da Costa Silva D, Rampelotto RF, Lorenzoni VV, Santos SOD, Damer J, Hörner M, et al. Phenotypic methods for screening carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and assessment of their antimicrobial susceptibility profile. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50(2):173-8. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0471-2016>
7. Vivas R, Dolabella SS, Barbosa AAT, Jain S. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - and New Delhi metallo-beta-lactamase-positive *K. pneumoniae* in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2020;53:e0064-2020. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0064-2020>
8. Ramos-Castañeda JA, Ruano-Ravina A, Barbosa-Lorenzo R, Paillier-Gonzalez JE, Saldaña-Campos JC, Salinas DF, et al. Mortality due to KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: Systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2018;76(5):438-48. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.02.007>
9. Barbosa LCG, Sousa JASE, Bordoni GP, De Oliveira Barbosa G, Carneiro LC. Elevated Mortality Risk from CRKp Associated with Comorbidities: Systematic Review and Meta-Analysis. *Antibiotics*. 2022;11(7):874. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070874>
10. Russotto V, Cortegiani A, Graziano G, Saporito L, Raineri SM, Mammina C, et al. Bloodstream infections in intensive care unit patients: distribution and antibiotic

resistance of bacteria. *Infect Drug Resist.* 2015;8:287-96. <https://doi.org/10.2147/IDR.S48810>

11. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pan drug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
12. Temkin E, Carmeli Y. Zero or More: Methodological Challenges of Counting and Estimating Deaths Related to Antibiotic-resistant Infections. *Clin Infect Dis.* 2019;69(11):2029-34. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz414>
13. Borghi M, Pereira MF, Schuenck RP. The Presence of Virulent and Multidrug-Resistant Clones of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Southeastern Brazil. *Curr Microbiol.* 2023;80(9):e03403 . <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03403-z>
14. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(9):785-96. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7)
15. Vásquez-Ponce F, Bispo J, Becerra J, Fontana H, Pariona JGM, Esposito F, et al. Emergence of KPC-113 and KPC-114 variants in ceftazidime-avibactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* belonging to high-risk clones ST11 and ST16 in South America. *Microbiol Spectr.* 2023;11(5):e00374-23 . <https://doi.org/10.1128/spectrum.00374-23>
16. Lai C, Ma Z, Luo Y, Gao Y, Wu Z, Zhang J, et al. Factors influencing mortality in intracranial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella Pneumoniae*. *Sci Rep.* 2024;14(1):e71660. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-71660-4>

Table I. Characteristics of patients with bacteremia due to *Klebsiella pneumoniae* receiving monotherapy or combination therapy.

	Total N= 109	Monotherapy/ without therapy* Patients N=22 (%)	Combination therapy Patients N=87 (%)	Univariate Analysis	
				P value	OR (95%CI)
Age (years), mean $\pm$ SD	53.0 $\pm$ 19.3	56.2 $\pm$ 16.2	52.2 $\pm$ 20.0	0.3888 ¹	-
Length of hospitalization until ICU admission (days), median (IQR)	2.0 (1.0 - 6.0)	1 (0.0 - 3.2)	2 (1.0 $\pm$ 7.0)	0.1903 ²	-
Length of hospitalization ICU, median (IQR)	16.0 (10.0 - 22.0)	14.5 (8.2 - 20.2)	16.0 (11.0 - 23.0)	0.4979 ²	-
Length of hospitalization (days), median (IQR)	20.0 (14.0 - 30.0)	16.0 (10.2 - 34.2)	22.0 (14.0 - 30.0)	0.1881 ²	-
Comorbid condition:					
Heart failure	45.0 (41.3)	13.0 (59.1)	32.0 (36.8)	0.0884 ³	2.483 (0.9782 - 6.101)
Nephropathy	17.0 (15.6)	4.0 (18.2)	13.0 (14.9)	0.7448 ³	1.265 (0.4105 - 4.145)
Malignancy	13.0 (11.2)	1.0 (4.5)	12.0 (13.8)	0.4598 ³	0.2976 (0.02660 - 1.888)
Diabetes Mellitus	19.0 (17.4)	3.0 (13.6)	16.0 (18.4)	<0.0001 ³	36.05 (9.964 - 121.8)
Chronic lung disease	7.0 (6.4)	1.0 (4.5)	6.0 (6.9)	0.7590 ³	0.7007 (0.2003 - 2.463)
Vascular disease	11.0 (10.1)	1.0 (4.5)	10.0 (11.5)	0.4567 ³	0.3667 (0.03231 - 2.479)
Charlson comorbidity index $\geq$ 3	26.0 (23.9)	5.0 (22.7)	21.0 (24.1)	>0.9999 ³	0.9244 (0.3410 - 2.813)
Admission ward:					
Medical	46.0 (42.2)	9.0 (40.9)	37.0 (42.5)	>0.9999 ³	0.9356 (0.3831 - 2.352)
Surgical	22.0 (20.2)	4.0 (18.2)	18.0 (20.7)	>0.9999 ³	0.8519 (0.2844 - 2.557)
Traumatology	41.0 (37.6)	9.0 (40.9)	32.0 (36.8)	0.8068 ³	1.190 (0.4829 - 3.022)
Source of infection:					
Primary bacteremia	56.0 (51.4)	13.0 (59.1)	43.0 (49.4)	0.4792 ³	1.478 (0.5903 - 3.593)
Lung infection	36.0 (33.0)	6.0 (27.3)	30.0 (34.5)	0.6172 ³	0.125 (0.2509 - 1.941)
Urinary tract infection	17.0 (15.6)	3.0 (13.6)	14.0 (16.1)	>0.9999 ³	0.8233 (0.2328 - 3.003)
Mortality in 30 days	45.0 (41.3)	6.0 (27.3)	39.0 (44.8)	0.1537 ³	0.4615 (0.1650 - 1.234)

*3 Patients without therapy are inside this group with one death. SD, standard deviation; IQR, Interquartile range; ICU, Intensive care unit; 1 Student's T test; 2 Mann Whitney Test; 3 Fisher's Exact Test.

Table II. Outcome of patients with bacteremia due to *Klebsiella pneumoniae* according to treatment regimen.

Treatment regimen	N dead/ treated*	Mortality (%)
Monotherapy:	5/19	26.3
Other Beta-lactams	2/7	28.6
Carbapenems	1/4	25.0
Fluoroquinolones	0/1	0.0
Glycopeptides	0/1	0.0
Cephalosporins 3 ^a and 4 ^a generation	2/6	33.3
Combination therapy:	40/87	46.0
Quadruple therapy	4/8	50.0
Triple therapy	18/38	47.4
Bi-therapy	18/41	43.9

*3 Patients without therapy, this group has one death with 33.3% mortality.

Table III. Univariate analysis of variables associated with 30-day mortality in patients with bacteremia due to *Klebsiella pneumoniae*.

Variable	30 DAY MORTALITY		P value	Univariate Analysis OR(95%CI)
	Survivor N=64(%)	Non-Survivor N=45(%)		
Age (years) median (IQR)	53.0 (35.0 - 61.0)	58.0 (44.0 - 71.5)	0.0625	-
Length of hospitalization, median (IQR)	20.5 (14.0 - 34.8)	18.0 (12.5 - 29.0)	0.4012	-
Length of hospitalization in ICU, median (IQR)	15.0 (10.3 - 22.8)	16.0 (9.5 - 22.0)	0.7003	-
Charlson comorbidity index ≥ 3	15.0 (23.4)	11.0 (24.4)	0.8226	0.8916 (0.3553 - 2.156)
Source of bacteremia:				
Primary bacteremia	34.0 (53.1)	22.0 (48.9)	0.7004	1.185 (0.5544 - 2.554)
Lung	22.0 (34.4)	14.0 (31.1)	0.6832	1.272 (0.5542 - 2.858)
Urinary tract	8.0 (12.5)	9.0 (20.0)	0.2989	0.5714 (0.1946 - 1.582)
Invasive procedures:				
Mechanical ventilation	8.0 (12.5)	8.0 (17.8)	0.5837	0.6607 (0.2176 - 2.011)
Hemodialysis Catheter	15.0 (23.4)	20.0 (44.4)	0.0238	0.3827 (0.1660 - 0.9113)
Bladder catheter	57.0 (89.1)	39.0 (86.7)	0.7687	1.253 (0.3707 - 3.743)
Comorbidities:				
Malignancy	4.0 (6.2)	5.0 (11.1)	0.4840	0.5333 (0.1569 - 1.950)
Nephropathy	9.0 (9.4)	8.0 (17.8)	0.6038	0.7568 (0.2744 - 2.225)
Diabetes mellitus	11.0 (17.2)	8.0 (17.8)	>0.9999	0.9599 (0.3374 - 2.678)
Infection for <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR	42.0 (65.6)	28.0 (62.2)	0.8394	1.159 (0.5461 - 2.628)
Carbapenem resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i>	38.0 (59.4)	32.0 (71.1)	0.2296	0.5938 (0.2559 - 1.361)
Target treatment:				
Monotherapy / without therapy*	16.0 (25.0)	6.0 (13.3)	0.1537	2.167 (0.8102 - 6.060)
Combination therapy	48.0 (75.0)	39.0 (86.7)	0.1537	0.4615 (0.1650 - 1.234)
Inappropriate empirical therapy	40.0 (62.5)	28.0 (62.2)	>0.9999	1.012 (0.4778 - 2.253)
Therapy included carbapenem	36.0 (56.2)	31.0 (68.9)	0.2313	0.5806 (0.2606 - 1.300)

*There are three patients without therapy in this group. IQR, Interquartile range; OR, Odds ratio; CI, Confidence interval; MDR, multidrug resistance.

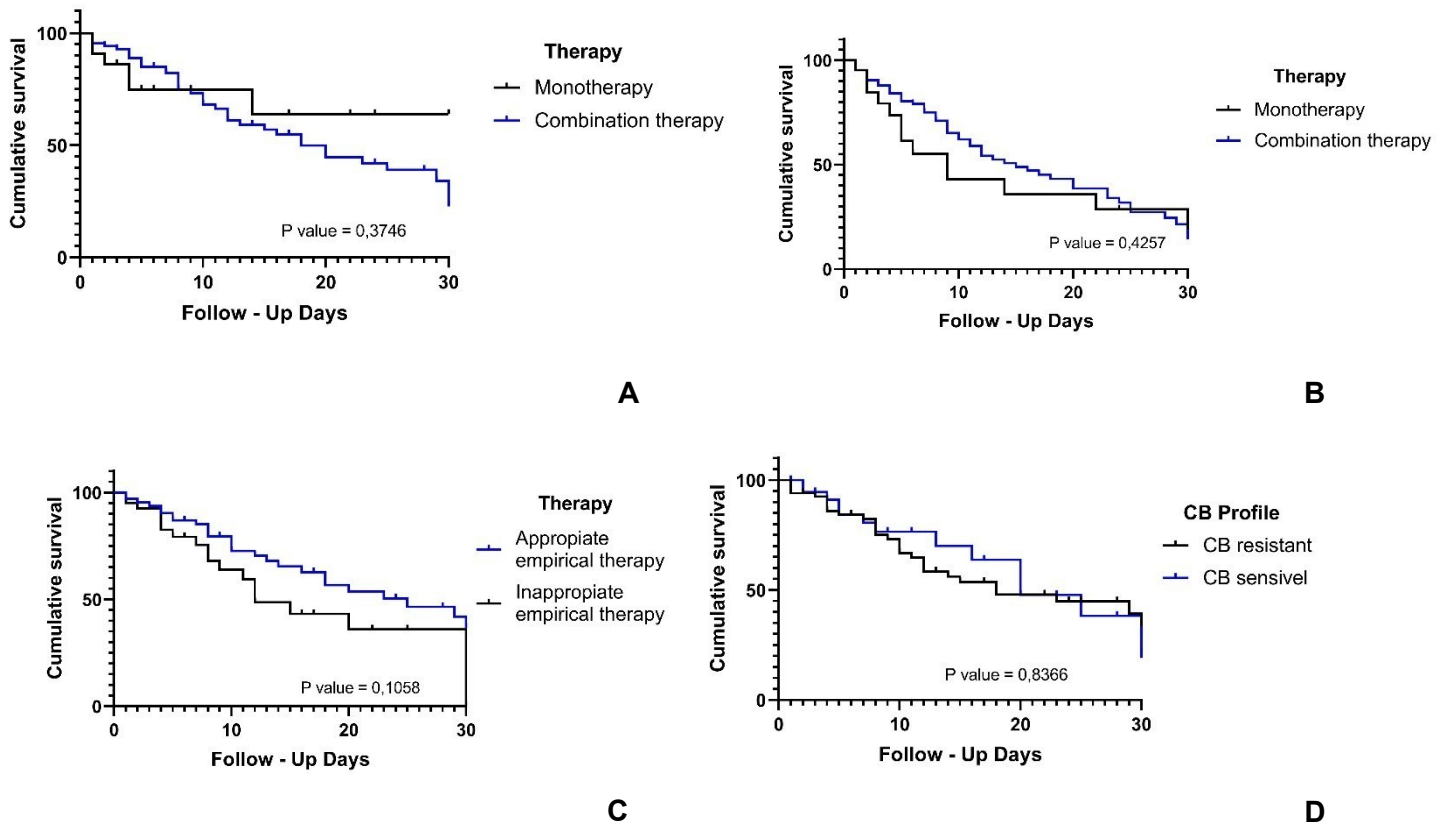


Figure 1. Kaplan Meier curves for survival of bacteremia caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: A) for a group of therapy, B) with Multi-drug resistance for a group of therapy, C) for a group of appropriate or inappropriate empirical therapy, D) for carbapenemase resistance profile

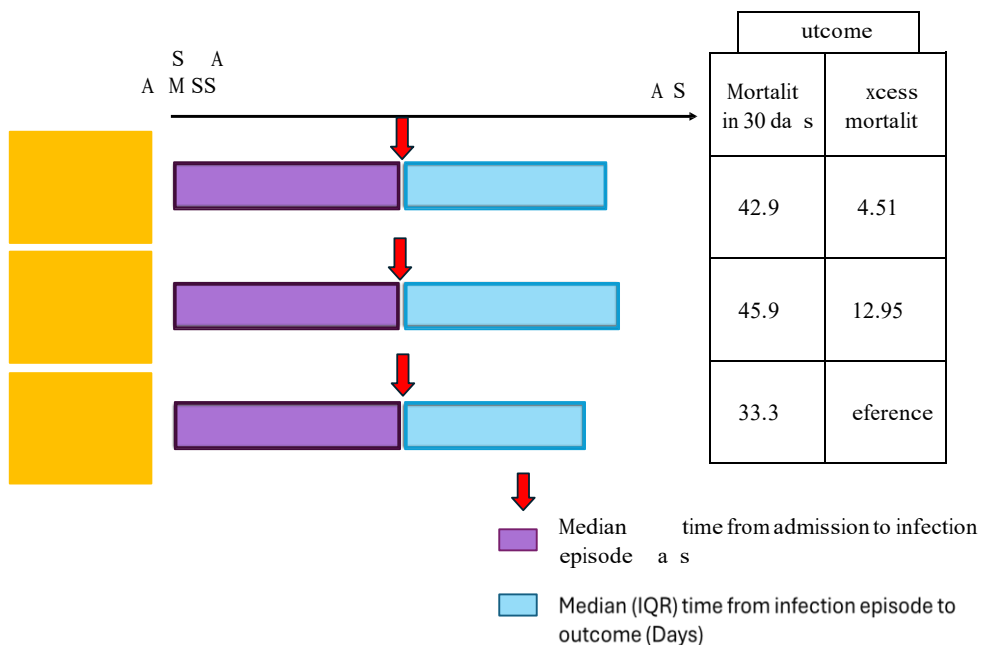


Figure 2. Study timeline of patient events concerning hospital admission, exposures, and outcomes. Abbreviations: CRKP, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; CSKP, carbapenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae*; MDR, multidrug-resistant; IQR, interquartile range.

$$\text{Excess mortality} = \frac{\# \text{ BSI} * P_0 * (aOR - 1) * (1 - P_0)}{aOR * P_0 + (1 - P_0)}$$

Figure 3. Equation excess mortality.

Abbreviations: BSI, bloodstream infection; P_0 , p-value; aOR, adjusted odds ratio.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

4. Considerações finais

Este trabalho contribui significativamente para a compreensão da epidemiologia de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente em hospitais terciários, destacando a complexidade do controle dessas infecções e a necessidade de abordagens multidisciplinares para enfrentar esse desafio de saúde pública.

- O estudo revelou uma alta prevalência de genes de resistência, como *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, e *bla*_{VIM}, além de genes de virulência como *entB*, *kfu*, *Aero*. Esses genes estão associados a infecções graves, complicadas e difíceis de tratar, cuja prevalência vai aumentando com os anos.
- A análise de PFGE identificou a presença de clones dominantes de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos, com disseminação geográfica específica dentro da cidade de Uberlândia. Isso sugere a ocorrência de transmissão cruzada nos hospitais.
- Pacientes internados em UTIs estão particularmente vulneráveis a infecções graves por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos, o que exige um reforço nas medidas de higiene e no manejo adequado de dispositivos invasivos. A identificação rápida de patógenos e seus perfis de resistência é fundamental para um tratamento mais eficaz e para melhorar os desfechos clínicos dos pacientes.
- *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos representa um desafio crítico para o tratamento de infecções hospitalares, e o estudo mostrou que a terapia antimicrobiana inadequada, está associada a taxas de mortalidade mais elevadas. A terapia combinada, embora mais comum, não reduziu significativamente a mortalidade comparado com a monoterapia antimicrobiana, indicando a necessidade de estratégias terapêuticas mais eficazes e personalizadas.
- O estudo reforça a necessidade de implementação de medidas de prevenção e controle de infecções, como a higienização das mãos, o manejo adequado de dispositivos invasivos e a adoção de protocolos de escalonamento de antibióticos. Essas medidas são essenciais para reduzir a incidência e o impacto das infecções por *K. pneumoniae* multirresistente em ambientes hospitalares.