HERMES RYOITI HIGASHINO

**ANÁLISE DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E
MICROBIOLÓGICAS EM COORTE RETROSPECTIVA DE
PACIENTES COM COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO POR *Klebsiella
pneumoniae* RESISTENTE A CARBAPENÊMICOS EM UNIDADE
DE TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa

SÃO PAULO

2020

HERMES RYOITI HIGASHINO

Análise de características clínicas e microbiológicas em coorte retrospectiva de pacientes com colonização e infecção por *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos em unidade de transplante de células tronco hematopoiéticas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa

SÃO PAULO

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Higashino, Hermes Ryoiti

Análise de características clínicas e
microbiológicas em coorte retrospectiva de pacientes
com colonização e infecção por *Klebsiella pneumoniae*
resistente a carbapenêmicos em unidade de
transplante de células tronco hematopoiéticas /
Hermes Ryoiti Higashino. -- São Paulo, 2020.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Silvia Figueiredo Costa.

Descritores: 1. Enterobacteriáceas resistentes a
carbapenêmicos 2. Transplante de células-tronco
hematopoéticas 3. *Klebsiella pneumoniae* 4. Infecções
por *Klebsiella* 5. Hospedeiro imunocomprometido
6. Infecção hospitalar

USP/FM/DBD-295/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

*Aos meus pais, Júlio e Marie, que sempre me
inspiraram e me encorajaram.*

Agradecimentos

À Profª Silvia Costa, por ser exemplo de dedicação e competência acadêmicas, pela paciência, conselhos e incentivo como minha orientadora. E especialmente, pela amizade.

A todos do LIM/49, em especial à Drª Roberta Ruedas Martins e Ana Paula Marchi Rosin, pela ajuda inestimável, que tanto enriqueceu este trabalho.

À Banca de Qualificação, Dras Maura Oliveira, Elisa Mendes e Paola Cappelano, por suas excelentes observações e sugestões que ajudaram a moldar esta tese.

Aos colegas da hematologia HCFMUSP e da SCIH HCFMUSP, pela parceria e capacidade profissional.

À Profª Anna Sara Levin, por despertar meu interesse pela infectologia na graduação e por sua capacidade e inteligência que continuam a inspirar.

Ao Max, Christina, Álvaro, Juliana, Luciana Casadio, Marcello, Ester, Luiza, Angela e todos os amigos do HC e da DMIP, especialmente do ambulatório de Tuberculose e do GRIDE, por seu apoio e compreensão durante a confecção deste trabalho.

À Laína e André, por ceder parte de seu precioso tempo livre da residência médica e auxiliar na coleta de dados.

Ao Marcelo, por ter sido um preceptor motivante e por ter me dado as primeiras oportunidades na infectologia, ainda que os caminhos profissionais tenham se distanciado um pouco.

À Ana Catharina, por toda sua ajuda e encorajamento, essencial para que esta tese fosse escrita. Mas em especial também por compartilhar sua visão particular sobre a ciência.

À Adriana, minha constante admiração por seu compasso moral e dedicação. Poder contar com sua parceria profissional e amizade é um privilégio.

Ao Prof Pignatari e Regina, Sumire, Vinicius, Matias, Bruno, Úrsula, Victor, Bárbara e Gabriel, pela cumplicidade, amizade e competência, especialmente neste ano tão desafiador e que exigiu tanto de nós.

À Laís, Larissa, Laína, Luciana, Oscar, Anninha, Úrsula e todos que se juntaram à equipe neste ano, pela amizade e pela paciência com meus longos períodos de ausência.

Ao Márcio, Tjeng, Patrícia (saudades...), Lucas e Sofia por ser minha “segunda” família por escolha.

À minha família, Júlio, Marie, Érika, Nelson, Yasmin e Gustavo, por ser meu porto seguro e minha casa.

Epígrafe

*"That without experimentation, a willingness to ask
questions and try new things, we shall surely
become static, repetitive, moribund."*

Anthony Bourdain. *Medium Raw*, chapter 16.

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. *Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver)/ Sistema Integrado de Bibliotecas da USP*; coordenadora ; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro... [et al.]. --3.ed. rev. ampl. mod. - - São Paulo : SIBi/USP, 2016.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. Introdução	22
1.1 Epidemiologia das infecções bacterianas após TCTH	24
1.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> Resistente aos carbapenêmicos (KRC)	25
1.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a polimixinas	27
1.4 Impacto da KRC na sobrevida em TCTH	28
1.5 Medidas de controle de infecção E prevenção da KRC	29
1.6 Sequenciamento do genoma completo bacteriano (SGC) no controle de infecção por bactérias MDR	31
1.7 Justificativa do Estudo	32
2. Objetivos	33
2.1 Objetivo Primário	34
2.2 Objetivos Secundários	34
3. Métodos	35
3.1 DADOS CLÍNICOS	39
3.1.1 Dados relacionados ao transplante	39
3.1.2 Dados relacionados à cultura da <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos	39
3.1.3 Dados relacionados à infecção por <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos	40
3.2 DADOS MICROBIOLÓGICOS	41
3.2.1 Amostras	41
3.2.1.1 Detecção de genes codificadores de KPC, OXA-48 e NDM e MCR-1	42
3.2.1.2 Análise de clonalidade por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	42
3.2.1.3 Sequenciamento do Genoma Completo Bacteriano (SGC)	45
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
3.4 ASPECTOS ÉTICOS	46
4. Resultados	47

4.1	COORTE DE PACIENTES NÃO-COLONIZADOS E COLONIZAÇÕES/INFECÇÕES POR KRC DOS PACIENTES SUBMETIDOS A TCTH.....	49
4.2	ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA ATÉ D+100 PÓS-TCTH DOS PACIENTES COLONIZADOS E INFECTADOS POR KRC.....	49
4.3	COLONIZAÇÃO POR KRC NA COORTE DE PACIENTES SUBMETIDOS A TCTH.....	50
4.4	INFECÇÕES POR KRC NA COORTE DE PACIENTES SUBMETIDOS A TCTH.....	52
4.4.1	Análise de fatores associados a óbito em 14 dias.....	54
4.5	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	55
4.5.1	Resultados de PCR para genes codificadores de carbapenemases <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{OXA-48} e <i>bla</i> _{NDM}	55
4.5.2	Perfis eletroforéticos entre os isolados de KRC	56
4.5.3	Resultados do Sequenciamento do Genoma Completo Bacteriano	58
4.6	INFECÇÃO POR KRC RESISTENTE À COLISTINA	64
5.	Discussão	67
6.	Conclusões	77
7.	Referências Bibliográficas	80
Apêndices		

Lista de abreviaturas e siglas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGN	Bacilos gram-negativos
<i>bla</i>	Betalactamase
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CC	Complexo Clonal
CDC	Centro de Controle de Doenças
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMV	Citomegalovirus
D-(valor)	dias antecedentes à infusão de células-tronco hematopoiéticas
D+(valor)	dias após infusão de células-tronco hematopoéticas
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DM	Diabetes melito
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
GES	<i>Guiana Extended-Spectrum betalactamase</i>
GIM	<i>German imipenemase</i>
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HEPA	<i>High efficiency particulate air filter</i>
IC	Intervalo de confiança
ICS	Infecção de corrente sanguínea

IMI	<i>Imipenem hydrolyzing carbapenemase</i>
IMP	<i>Active on imipenem</i>
Inc.	<i>Incorporated</i>
IPPM	Infecção de pele e partes moles
IRAS	Infecção relacionada a assistência à saúde
ITU	Infecção do trato urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
KRC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MALDI-TOF	<i>Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight</i>
MASCC	Multinational Association of Supportive Care in Cancer
MDR	Multirresistentes
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
NDM	<i>New Delhi metalobetalactamase</i>
NMC	<i>Non-metalloenzyme carbapenemase</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
OXA	<i>Oxacillinase</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	<i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i>
PFT	<i>Pulsed-field Type</i>
REDCap	Research Electronic Data Capture
SAPSII	<i>Simplified Acute Physiologic Score</i>
SCIH	Subcomissão de Controle de Infecção Hospitalar
SGC	Sequenciamento do Genoma Completo Bacteriano

SME	<i>Serratia marcescens enzyme</i>
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
sp.	Espécie
SPM	<i>São Paulo metalobetalactamase</i>
ST	<i>Sequence Type</i>
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
TGI	Trato gastrointestinal
TMO	Transplante de Medula Óssea
TSB	Caldo soja tripticaseína
UK	Reino Unido
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VIM	<i>Verona integron-encoded metalloβ-lactamase</i>

Lista de símbolos

µg	Micrograma
Mg	Miligrama
µl	Microlitro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
Cm	Centímetro
mm ³	Milímetro cúbico
min	Minuto
rpm	Rotações por minuto
°C	Graus centígrados

Lista de figuras

Figura 1	Linha do tempo das principais complicações infecciosas no período peri-transplante de células-tronco hematopoiéticas..	24
Figura 2	Linha do tempo do histórico desde a detecção de KRC na Unidade TCTH-HCFMUSP e descrição das análises realizadas.....	38
Figura 3	Dendrograma dos 60 isolados de 31 colonizações e 29 infecções por <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos dos pacientes submetidos a TCTH no HCFMUSP disponíveis no banco de cepas do LIM-49 – HCFMUSP.....	57
Figura 4	Dendrograma dos isolados de infecção por <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos dos pacientes submetidos a TCTH no HCFMUSP disponíveis no banco de cepas do LIM-49/HCFMUSP.....	58
Figura 5	Análise por PCR para <i>bla</i> NDM, <i>bla</i> OXA-48 e <i>mcr-1</i> e Sequenciamento do Genoma Completo Bacteriano utilizando ferramenta <i>RESFINDER</i> para pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos de 17 isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos do banco de cepas de pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas do HCFMUSP.....	60
Figura 6	Análise por sequenciamento genômico completo de mutações de porina, plasmídeos e <i>Multilocus sequence typing</i> de 17 isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos do banco de cepas de pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas do HCFMUSP.....	61
Figura 7	Análise por sequenciamento genômico completo de genes	

de virulência para adesão, toxina, protease, cápsula e bomba de efluxo de 17 isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos do banco de cepas de pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas do HCFMUSP..... 62

Figura 8 Análise por sequenciamento genômico completo de genes de virulência para aquisição de ferro, metabolismo de alantoína e genes de regulação de 17 isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos do banco de cepas de pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas do HCFMUSP..... 63

Figura 9 Dendrograma e análise de genes de resistência a colistina de 7 isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e colistina de pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas no HCFMUSP..... 66

Lista de Gráficos

- Gráfico 1** Número de colonizações e infecções por *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (KRC) x Número de transplantes de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) no período 2008-15 no HCFMUSP..... 48
- Gráfico 2** Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier até o D+100 pós-transplante comparando a coorte geral(NC) de pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) com pacientes colonizados(C) por *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (KRC) e pacientes com infecção (I) por KRC no HCFMUSP no período 2012-15..... 50

Lista de tabelas

Tabela 1	Iniciadores utilizados para detecção de genes de resistência <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>mcr-1</i> por reação de cadeia de polimerase.....	42
Tabela 2	Descrição de dados demográficos e clínicos dos 105 pacientes com colonização e infecção por KRC nos pacientes submetidos a TCTH do HCFMUSP 2012-15.....	51
Tabela 3	Descrição de dados clínicos e do tratamento de 30 infecções por KRC em pacientes submetidos a TCTH do HCFMUSP 2012-15.....	53
Tabela 4	Fatores associados a óbito em 14 dias após infecção por KRC em 30 pacientes submetidos a TCTH no HCFMUSP 2012-15.....	55
Tabela 5	Dados demográficos, clínicos e de tratamento de casos de infecções por KRC resistente à colistina em coorte de pacientes submetidos a TCTH no HCFMUSP.....	64

Resumo

Higashino HR. *Análise de características clínicas e microbiológicas em coorte retrospectiva de pacientes com colonização e infecção por Klebsiella pneumoniae resistente a carbapenêmicos em unidade de transplante de células tronco hematopoiéticas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

A *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (KRC) é um patógeno de crescente relevância com significativa morbimortalidade. A colonização do trato gastrointestinal pode servir como fonte endógena de infecção e disseminação desses microorganismos no ambiente hospitalar. Pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas(TCTH) são uma população particularmente susceptível a infecções bacterianas nosocomiais. Foi realizado estudo de coorte retrospectiva de pacientes internados na Unidade de TCTH-HCFMUSP das colonizações e infecções por KRC de 2008-15. KRC foi identificada pela primeira vez na unidade em 2008 em amostra de colonização e em 2009 em amostra de infecção. A partir de 2012 foi iniciada vigilância ativa de colonização por KRC. Entre 2012-15 foram realizados 569 TCTH com 105 pacientes colonizados/infectados por KRC. A sobrevida no D+100 pós-TCTH na análise de Kaplan-Meier foi de 85.9% nos não-colonizados por KRC e significativamente menor nos colonizados (75.4% $p = 0.02$) e infectados por KRC (35.7% $p < 0.001$). Os 75 pacientes colonizados foram comparados com 30 pacientes com infecção por KRC: no momento da cultura positiva, pacientes infectados apresentavam na análise bivariada de maior probabilidade de neutropenia(RR=1,63 IC 1,28-2,08 $p < 0.0001$) e evolução para terapia intensiva(RR 2,75 IC 1,54-4,9 $p < 0,0001$). O principal sítio de infecção foi corrente sanguínea (23), a maioria (24) encontrava-se neutropênico grave ($< 100/\text{mm}^3$) e 14 eram previamente colonizados por KRC. Dezenove pacientes foram a óbito, sendo 11 em < 14 dias da infecção (36,7%) e 8 (26,7%) em 30 dias. À análise bivariada de correlação de óbito em 14 dias foi significativa a associação com sexo masculino (RR=0,51 IC0,28-0,92

p=0.02) e internação em terapia intensiva (RR=2,57 IC1,44-4,59 p<0,001) e houve tendência de associação com medula óssea como fonte de células (RR=2,62 IC0,79-8,7 p=0,06). Na análise multivariada apenas sexo masculino (OR 0,09 IC0,009-0,83 p=0,03) foi associado a menor risco de óbito. Foi identificada uma série de 12 casos de infecção por KRC resistente à colistina em 11 pacientes no período com alta mortalidade (81,8%), sendo 6 mortes em <14 dias. Sessenta isolados estavam disponíveis para análise microbiológica no banco de cepas do LIM-49/HCFMUSP e 17 foram analisados por sequenciamento do genoma completo (SGC). A carbapenemase mais frequente foi *bla*_{KPC}(57) e 3 isolados foram também positivos para *bla*_{NDM}. Os isolados foram policlonais por *Pulsed-field gel electrophoresis*. Dos 17 isolados analisados por SGC a tipagem molecular por MLST identificou 4 STs: ST340 (10/17), ST11 (4/17), ST437 (2/17) e ST16 (1/17). Todos os isolados sequenciados apresentavam genes de resistência a múltiplas classes de antibióticos e mutações de porinas *ompk36* e *ompk37*, *replicons* pertencentes a plasmídeos e predominaram genes de virulência para aquisição de ferro e adesão bacteriana. Dentre os isolados resistentes a colistina, detectou-se *mcr-1* em 2 isolados e a maioria apresentava mutações nos genes *pmrCAB*, *mgrB* e *phoQ*. Pacientes submetidos a TCTH apresentam menor sobrevida em D+100 de transplante quando colonizados e infectados por KRC, com significativa morbimortalidade associada. Predominou na unidade a *bla*_{KPC} como principal carbapenemase mas a detecção de *bla*_{NDM} e resistência a colistina alerta para o potencial de infecções pan-resistentes virtualmente intratáveis por KRC.

Descritores: Enterobacteriáceas resistentes a carbapenêmicos; Transplante de células-tronco hematopoéticas; *Klebsiella pneumoniae*; Infecções por *Klebsiella*; Hospedeiro imunocomprometido; Infecção hospitalar.

Abstract

Higashino HR. *Clinical and microbiological characteristics of patients with Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae colonization and infection in a retrospective cohort in a hematopoietic stem cell transplant unit* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRK) is a pathogen with growing relevance and significant associated mortality. Gastrointestinal tract colonization is a potential source of endogenous infection and dissemination to the hospital environment. Hematopoietic stem-cell transplant (HSCT) patients are particularly vulnerable to healthcare-associated infection, especially during neutropenia. This study is a retrospective cohort of patients admitted to the HSCT unit from HCFMUSP with CRK colonization and infection from 2008-15. First CRK colonization was identified in 2008 and first infection in 2009. Active surveillance for CRK colonization was implemented in 2012. From 2012-15, 569 HSCT were performed with 105 patients with CRK colonization/infection. Kaplan-Meier Survival Curve at D+100 post-HSCT was 85.9% survival for non-colonized patient and was significantly higher than CRK colonized (75.4% $p=0.02$) and infected patients (35.7% $p<0.001$). The 75 CRK-colonized patients were compared with the 30 CRK-infected: at detection, CRK-infected were more likely to be neutropenic (RR=1.63 CI1.28-2.08 $p<0.0001$) and to need intensive care (RR=2.75 CI1.54-4.9 $p<0.0001$). Main infection site was bloodstream infection (23), most (24) were severely neutropenic ($<100/\text{mm}^3$) and fourteen were previously colonized with CRK. Nineteen patients died, with 11 deaths <14 days from infection(36.7%) and 8 within 30 days (26.7%). Bivariate analysis for factors associated with death showed statistical significance with association with male sex (RR=0.51 CI0.28-0.92 $p=0.02$) and intensive care admission (RR=2.57 CI1.44-4.59 $p<0.001$) and there was a trend toward higher risk with bone marrow as stem-cell source(RR=2.62 IC0.79-8.7 $p=0.06$). In a subsequent multivariate analysis, only male gender was associated with lower risk of death (OR 0.09 IC0.009-0.83 $p=0.03$). From the CRK infection

cases, a series of 12 colistin-resistant CRK infections were identified in 11 patients with high mortality (81.8%), 6 of which within 14 days of infection. Sixty isolates were available from strain collection at LIM/49-HCFMUSP and 17 were analyzed by whole-genome sequencing (WGS). Carbapenemase detection showed *bla*_{KPC} was the most frequent gene(57) and 3 isolates were positive for *bla*_{NDM}. Clonality analysis by Pulsed-field gel electrophoresis revealed isolates to be polyclonal. WGS Multilocus sequencing typing analysis identified ST340 (10/17), ST11 (4/17), ST437 (2/17) and ST16 (1/17). Resistance genes for multiple antibiotic classes, *ompk36* and *ompk37* mutations, plasmid-related replicons and iron acquisition and bacterial adhesion virulence genes were identified in all 17 isolates. In colistin-resistant isolates, *mcr-1* was detected in 2 and the majority also had sequence mutations detected in *pmrCAB*, *mgrB* and *phoQ*. In this cohort, CRK colonized and infected HSCT patients had lower survival at D+100 post-transplant with significant morbimortality. The most frequent carbapenemase was *bla*_{KPC} but detection of other resistance mechanisms such as *bla*_{NDM} and *mcr-1* is concerning, with the potential for virtually untreatable CRK infections in a highly immunocompromised patient population.

Descriptors: Carbapenem-resistant enterobacteriaceae; Hematopoietic stem cell transplantation; *Klebsiella pneumoniae*; *Klebsiella* infections; Immunocompromised host; Cross infection.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

O transplante de células tronco-hematopoiéticas (TCTH) é uma modalidade terapêutica que vem sendo cada vez mais utilizada como opção para tratamento de diversas patologias como neoplasias hematológicas e doenças imunológicas¹.

Podemos classificar os TCTH de acordo com a relação entre doador e receptor do transplante e a origem das células progenitoras. Os TCTH podem ser autólogos, quando as células-tronco provêm do próprio paciente, ou alogênicos, quando são coletadas de outro doador (seja aparentado, um voluntário ou de banco de células de cordão umbilical). Quanto à origem, as células-tronco podem ser obtidas através do sangue periférico, da medula óssea ou de cordão umbilical².

No Brasil, foram realizados 14579 transplantes de medula óssea no período de 2008-15 segundo dados da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos³. O Estado de São Paulo concentra o maior número absoluto de transplantes de células tronco hematopoiéticas no país, e este número vem crescendo, sendo 924 em 2014⁴ e 1765 em 2019³.

O TCTH ainda é um procedimento médico muito complexo, exigindo inúmeras medidas de suporte ao paciente durante todo o período peri-transplante, como por exemplo passagem de cateter venoso central para infusão de medicamentos; uso de nutrição parenteral; transfusão de hemoderivados e uso de imunossupressores para prevenção de rejeição do transplante e da Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH)⁵.

A despeito da evolução nos regimes de condicionamento e de profilaxia antimicrobiana, a ocorrência de eventos infecciosos permanece uma importante causa de morbimortalidade nos pacientes submetidos a TCTH⁶. A figura 1 descreve os principais agentes infecciosos no período peri-TCTH.

Figura 1 - Linha do tempo das principais complicações infecciosas no período peri-transplante de células-tronco hematopoiéticas.

Legenda: TCTH – Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas; CMV – Citomegalovirus
Figura cedida por Luciana Vilas Boas Casadio

1.1 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES BACTERIANAS APÓS TCTH

Logo após o TCTH, antes da enxertia da nova medula, ocorre um período de profunda pancitopenia. Nesse momento, é significativo o risco de infecção bacteriana, uma vez que, além da neutropenia, esse paciente se encontra internado, com dispositivos invasivos (cateter venoso central) e alteração nas barreiras mecânicas de defesa (mucosite)⁷.

Um estudo de uma coorte de pacientes na Itália submetidos a TCTH no período entre 1998-2002 encontrou risco cumulativo de 20,6% de infecção de corrente sanguínea em 30 dias e mortalidade de 28% em 180 dias⁸. De forma similar, em uma coorte sueca avaliando 521 transplantes alogênicos de células tronco hematopoiéticas de 2001-2008, no período pré-enxertia, verificou-se uma incidência de infecção de corrente sanguínea de 21% (92% etiologia bacteriana) com mortalidade em 120 dias de 21%⁹. E em outra coorte multicêntrica de pacientes submetidos a TCTH alogênico em 4 centros nos Estados Unidos de 2006-2011, 52% dos pacientes apresentaram bacteremia e a mortalidade por infecção foi de 21%¹⁰.

Na última década verificou-se uma mudança global no perfil dos microorganismos causadores de infecção no pacientes submetidos a TCTH, com elevação na proporção de bacilos gram-negativos (BGN) em relação aos

cocos gram-positivos (que predominavam na década de 70), possivelmente relacionada ao uso de profilaxia antimicrobiana ¹¹.

Esse aumento nas infecções causadas por BGN parece vir acompanhado também em maior frequência de isolados multirresistentes (resistentes a 3 ou mais classes de antimicrobianos) ¹². Em estudo australiano comparando dois períodos de HSCT (2001-4 x 2007-10) a ocorrência de BGN multirresistentes (MDR) produtores de betalactamase de espectro estendido variou significativamente de 32 para 51% no período ¹³. Nesse mesmo estudo, a infecção de corrente sanguínea foi significativamente associada com mortalidade em 7 dias após a cultura positiva (*Odds Ratio* 3.61, IC95%: 1.40–9.32, $p = 0.008$).

Na unidade de TCTH do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), no período de 2001-2009, predominaram os bacilos gram-negativos (52%) como agentes de infecção de corrente sanguínea (ICS) durante a neutropenia ¹⁴.

Em outro estudo realizado na mesma unidade que avaliou 296 pacientes após TCTH, 190 destes apresentaram febre durante a neutropenia e 23 evoluíram para óbito, sendo que infecção de corrente sanguínea por BGN foi fator de risco independente para óbito nos pacientes submetidos a TCTH alogênico na análise multivariada ¹⁵.

Essa tendência mundial de aumento na incidência de infecção por bactérias MDR com significativa morbimortalidade fez com que a Organização Mundial de Saúde declarasse em 2019 a Resistência aos Antimicrobianos como uma das 10 maiores ameaças à saúde global ¹⁶.

1.2 *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS (KRC)

Os BGN apresentam inúmeros mecanismos de resistência a antibióticos (p.ex. produção de beta-lactamases, alteração de membrana externa, bombas de efluxo, etc.) ¹⁷.

Nos últimos anos tem sido descrita uma epidemia global de infecções por BGN produtores de carbapenemases, enzimas capazes de hidrolisar

diversos antimicrobianos betalactâmicos, especialmente aqueles da classe dos carbapenêmicos^{18,19}.

As carbapenemases constituem um grupo diverso de enzimas com diferenças em sua estrutura molecular e composição. Considerando a homologia de aminoácidos de sua composição, as betalactamases podem ser divididas em 4 classes (A, B, C, D)²⁰. De acordo com essa classificação, as carbapenemases podem ser divididas da seguinte forma²¹:

Classe A: *Serratia marcescens* enzymes (SME), *Non-metalloenzyme carbapenemase* (NMC), *Imipenem hydrolyzing carbapenemase* (IMI), enzimas predominantemente cromossômicas; e *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) e *Guiana Extended-Spectrum betalactamase* (GES), que são codificadas em elementos genéticos móveis;

Classe B: Metallobetalactamases (*Imipenem hydrolyzing carbapenemase* - IMP, *Verona integron-encoded metallobetalactamase* - VIM, *German imipenemase* - GIM, *São Paulo Metallobetalactamase* - SPM), inicialmente descritas em bactérias ambientais e patógenos oportunistas (*Bacillus*) e identificada em *Pseudomonas aeruginosa* em 1991 em elemento genético móvel e *New Delhi Metallobetalactamase* (NDM-1), descrita em 2009 em elemento genético móvel em *Klebsiella pneumoniae*²²

Classe D: *Oxacillinases* (OXA), cuja primeira descrição ocorreu em *Acinetobacter baumannii* (OXA-23) em 1993. Entre os *Enterobacterales*, a carbapenemase mais relevante da classe é a OXA-48, identificada na Turquia em 2003²³.

A primeira descrição de KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) ocorreu em 2001, em uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* proveniente de um hospital dos Estados Unidos²⁴. No Brasil, os primeiros relatos de cepas produtoras de KPC ocorreram em 2009, em isolados de 2005 de hospitais de São Paulo²⁵ e de 2006 do Recife²⁶. Desde então as infecções por enterobactérias produtoras de KPC foram sendo descritas associadas a surtos hospitalares nos EUA e tornando-se endêmica em hospitais em países da Europa e da América Latina^{19,27}. No Brasil, a *Klebsiella pneumoniae* foi o agente etiológico mais frequente notificado em infecções de corrente sanguínea em UTI com crescimento na resistência aos carbapenêmicos de

25,3% para 43,3% no período 2011-15²⁸. No Estado de São Paulo também houve aumento significativo na resistência aos carbapenêmicos em isolados de *Klebsiella pneumoniae* de 14% em 2005 para 53% em 2018 segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”²⁹.

No HCFMUSP, em estudo realizado na Unidade de Transplante Renal, foram identificados 31 casos de infecção relacionada a assistência à saúde (IRAS) por *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC no período de 2009 a 2013³⁰. Em outro estudo avaliando infecção por este microorganismo em pacientes do Instituto do Câncer – HCFMUSP no mesmo período, foram descritos 83 episódios de IRAS com mortalidade em 30 dias de 57,8%³¹

Na população de pacientes submetidos a TCTH, não existem dados específicos disponíveis sobre KRC nos Centros de Transplante de Medula Óssea do Brasil.

1.3 *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTE A POLIMIXINAS

As polimixinas são antimicrobianos polipeptídicos com ação contra BGN por meio da interação com as moléculas de lipopolissacarídeos da membrana externa destas bactérias. Estão disponíveis para uso em infecções em seres humanos desde a década de 60, mas com o surgimento de novas classes de antimicrobianos com menor toxicidade foram sendo menos utilizadas nas décadas subsequentes³².

Com o aumento na frequência das infecções por BGN MDR surgiu a necessidade de novos antimicrobianos para o tratamento desses patógenos. Entretanto, no Brasil, atualmente apenas a combinação ceftazidima-avibactam está aprovada para uso no tratamento de infecção intra-abdominal complicada, infecção do trato urinário e pneumonia nosocomial mas sua disponibilidade ainda é restrita pelo custo no cenário de hospitais públicos³³.

Além disso, é importante que se assegure o uso prudente e racional dos novos antimicrobianos para evitar o rápido desenvolvimento de resistência³⁴. Neste contexto, na última década, houve o ressurgimento do uso de polimixina como uma das poucas opções terapêuticas de resgate no tratamento de infecções por BGN MDR³⁵.

Em 2015 foi descrito na China o primeiro mecanismo de resistência a colistina mediado por plasmídeo *mcr-1*³⁶. No Brasil já foram descritas cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC e do gene *mcr-1*³⁷.

Em um estudo de 2016 que avaliou isolados clínicos de *K. pneumoniae* de pacientes de 10 hospitais de São Paulo, foi detectada resistência a colistina em 27.1% das cepas de KRC no ano de 2015 alertando para o risco do surgimento de infecções virtualmente intratáveis por BGN MDR³⁸. No HCFMUSP, um estudo de 2019 descreveu uma série de casos de 28 pacientes com infecção por KRC resistente à colistina com mortalidade de 53% em 30 dias³⁹

1.4 IMPACTO DA KRC NA SOBREVIVÊNCIA DE TCTH

A população de paciente submetidos a TCTH é particularmente vulnerável a infecções bacterianas e há crescente preocupação com o aumento na incidência mundial de infecções por KRC.

Alguns estudos sugerem que a própria colonização do trato gastrointestinal por BGN MDR pode afetar adversamente o resultado de TCTH. Em uma coorte de pacientes submetidos a transplante alogênico⁴⁰ na Polônia, a mortalidade não relacionada a recidiva em 24 meses foi maior em colonizados que em não colonizados (42% versus 11% $p < 0.001$). Em outro estudo alemão de 2017⁴¹ com pacientes submetidos a transplantes autólogos, a mortalidade não relacionada a recidiva de doença também foi significativamente maior nos pacientes colonizados por BGN MDR (25,4% x 3% nos não-colonizados. Entretanto, outros estudos que avaliaram maior número de colonizações com BGN resistentes a carbapenêmicos em TCTH não demonstraram maior mortalidade em pacientes colonizados^{42,43}.

Nos casos de infecção por KRC em pacientes submetidos a TCTH, há menos controvérsia sobre a associação com importante morbimortalidade. Em uma coorte multicêntrica italiana foram encontradas 87 casos de infecção por KRC com mortalidade de 64,4% nos pacientes submetidos a TCTH alogênico⁴⁴. Em outro estudo recente realizado na unidade de TCTH do HCFMUSP, no período de 2014-5 foram descritos 8 episódios de infecção de

corrente sanguínea por *Klebsiella* MDR. Idade acima de 62 anos ($p=0.03$), uso de nutrição parenteral total ($p<0.001$) e colonização prévia por BGN MDR ($p=0.002$) foram fatores associados a infecção de corrente sanguínea por BGN MDR⁴⁵.

1.5 MEDIDAS DE CONTROLE DE INFECÇÃO E PREVENÇÃO DA KRC

As medidas de prevenção e controle de infecção relacionada à assistência à saúde já são parte essencial na qualidade de assistência e na segurança do paciente⁴⁶. Considerando a importante morbimortalidade e as limitações terapêuticas no tratamento das infecções por BGN resistentes a carbapenêmicos, foram publicadas diversas diretrizes para medidas de controle e prevenção de infecção por estas bactérias^{47,48}. Entre as medidas instituídas são recomendadas mudanças comportamentais com otimização da adesão à higiene de mãos e precauções de contato, educação dos profissionais de saúde, redução de uso de dispositivos invasivos como cateteres venosos centrais e sondas vesicais de demora e uso racional de antimicrobianos.

Além disso, o controle da disseminação de BGN resistentes a carbapenêmicos em hospitais também inclui a implementação de uma estratégia multimodal para o manejo dos pacientes colonizados por BGN MDR com identificação precoce do microorganismo e implementação de precauções de contato, rastreamentos de contato, limpeza do ambiente, banho de clorexidina e a vigilância ativa para colonização por bactérias multirresistentes⁴⁸.

A transmissão horizontal de *Klebsiella pneumoniae* pelas mãos de profissionais de saúde por contato com reservatórios ambientais ou pacientes colonizados é considerada um fator importante na disseminação desse microorganismo no ambiente hospitalar. Uma parcela significativa dos pacientes colonizados por *Klebsiella pneumoniae* não é detectada pelas culturas solicitadas de espécimes clínicos dos pacientes⁴⁹. A vigilância ativa com coleta periódica de culturas de vigilância para bactérias MDR permite a identificação precoce de paciente com colonização por microorganismos MDR

durante a hospitalização a fim de possibilitar o isolamento e implementação de precauções de contato para a redução de transmissão. A Sociedade Européia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas recomenda fortemente a realização de vigilância ativa de BGN MDR em situação de surto e sugere sua realização em conjunto com outras medidas quando esses microorganismos são endêmicos no serviço⁴⁷. Em um estudo na cidade de Nova Iorque, a implantação de um programa de controle de infecção hospitalar que incluía a realização de vigilância ativa com culturas de swab retal semanais resultou em redução significativa no número de culturas positivas para CRK, mas não de outros microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp. ou *Enterococcus* sp. resistente à vancomicina⁵⁰. Na unidade de TCTH do HCFMUSP, desde 2012 é realizada vigilância ativa de colonização por KRC com culturas semanais de swab retal ou cultura de fezes (em pacientes neutropênicos graves) e instituição de precauções de contato para os pacientes colonizados.

A colonização por bactérias MDR pode servir como fonte endógena de infecção, especialmente em população vulnerável como pacientes submetidos a TCTH, e pode contribuir para a disseminação desses microorganismos no ambiente e para as mãos dos profissionais de saúde⁵¹. A fim de reduzir a carga microbiana na pele dos pacientes e consequentemente o risco de infecção e disseminação de bactérias colonizantes, uma das medidas recomendadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o banho com clorexidina a 2% em pacientes internados em UTI e em situações especiais como em unidades com taxas elevadas de ICS ou pacientes de alto risco para consequências desfavoráveis (presença de próteses, imunossupressão grave, etc)⁴⁶. Em ensaio clínico randomizado envolvendo 74 UTIs nos Estados Unidos, a implantação de rotina universal de banho com clorexidina e descolonização nasal com mupirocina foi associada a uma redução significativa nos episódios de infecção de corrente sanguínea quando comparada a descolonização direcionada para carreadores de *Staphylococcus aureus* ou apenas isolamento dos pacientes colonizados⁵². Em outro estudo *quasiexperimental* o banho diário com clorexidina 2% foi implementado em conjunto com um pacote de outras medidas para o controle de surto por KRC em um hospital nos EUA⁵³.

Entretanto, há a preocupação que o uso amplo no ambiente hospitalar da clorexidina pode levar ao surgimento de resistência a este antisséptico⁵⁴. Há evidência que a exposição de cepas de *Klebsiella pneumoniae* a clorexidina pode levar ao surgimento de resistência de cruzada à polimixina⁵⁵.

Na unidade de TMO do HCFMUSP, a implantação de rotina de banho diário com clorexidina 2% em 2009 foi associada a uma diminuição significativa nas taxas de colonização e infecção por *Enterococcus* resistente à vancomicina ($p = 0.001$)⁵⁶. Não houve, entretanto, diminuição de colonização ou infecção por BGN MDR na unidade, tendo sido detectada elevação nesta taxa nos últimos anos do estudo.

1.6 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO BACTERIANO (SGC) NO CONTROLE DE INFECÇÃO POR BACTÉRIAS MDR

A implementação de um programa bem sucedido de controle de infecção hospitalar está diretamente associada à participação ativa do laboratório de microbiologia⁵⁷⁻⁵⁹.

O papel do laboratório vai além da rápida e correta identificação de microorganismos e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, mas também na caracterização de patógenos e tipagem para monitoramento e investigação de surtos hospitalares⁵⁷. Nos últimos anos, avanços na tecnologia de sequenciamento de nova geração tornaram factível a realização do Sequenciamento do Genoma Completo Bacteriano (SGC)⁶⁰.

O uso de SGC tem o potencial de fornecer informações sobre o cromossomo e elementos genéticos móveis de patógenos e sua taxonomia, auxiliando na identificação de surtos, bem como caracterizar genes de resistência e virulência⁶⁰. Entretanto, em nosso meio, ainda não há disponibilidade ampla do SGC considerando os custos e a complexidade técnica de realização.

Os métodos ainda mais comumente utilizados na investigação e análise de clonalidade de populações bacterianas são a tipagem por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e a *Multilocus Sequence Typing* (MLST)^{60,61}.

Após a introdução dos primeiros isolados de KRC em 2005, houve

rápida disseminação e o Brasil tornou-se uma região endêmica para este microorganismo. Estudos para a caracterização molecular de isolados KRC provenientes de hospitais no Brasil observaram que a maioria dos isolados pertencem ao Complexo Clonal (CC) CC258, particularmente do *Sequence Type* (ST) ST437, ST258 e ST11⁶²⁻⁶⁵. Em estudo recente⁶⁶ de coorte retrospectiva em hospital universitário em São Paulo de 165 casos de infecção de corrente sanguínea por KRC, a maioria (66%) pertencia ao CC258. Foi descrito nesta coorte um clone hipervirulento pertencente ao ST16 (carreando *bla*_{KPC-2} e até 14 genes de virulência) que foi associado a maior risco de óbito.

1.7 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Pacientes submetidos a TCTH são uma população de alto risco para desenvolver infecções por BGN MDR e com alta morbidade e mortalidade. A *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos é um patógeno de crescente relevância mundial e de importância em pacientes imunossuprimidos, mas a sua epidemiologia e características microbiológicas ainda não foram bem descritas em TCTH.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Descrever as características clínicas, epidemiológicas, microbiológicas e moleculares das colonizações e infecções por *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos isoladas em pacientes internados na Unidade de Transplante de Medula Óssea do HCFMUSP.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- a) Comparar a sobrevida da coorte de pacientes submetidos a TCTH com os pacientes com colonização e com infecção por *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos.
- b) Descrever as características clínicas e epidemiológicas das colonizações e infecções por *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e avaliação de fatores associados a óbito em 14 dias da infecção.
- c) Caracterizar as características microbiológicas dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos por meio de:
 - Identificação de presença de genes produtores de carbapenemase e
 - Identificação de genes implicados com mecanismos de resistência e virulência por sequenciamento total do genoma bacteriano
 - Análise da clonalidade dos isolados
- d) Descrever uma série de casos de pacientes com infecção por *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e à colistina.

3. Métodos

3. MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo comitê de ética e pesquisa (CEP) do HCFMUSP.

Foi realizado estudo de coorte retrospectiva analisando dados de prontuário dos pacientes internados na Unidade de Transplante de Medula Óssea do HCFMUSP no período de 01 de janeiro de 2012 a 31 de dezembro de 2015. Foi realizado também estudo laboratorial a partir de isolados bacterianos de amostras clínicas obtidas desses pacientes no mesmo período e a correlação dos achados laboratoriais com os dados clínicos dessa coorte.

LOCAL DO ESTUDO

Os dados foram coletados na unidade de internação do Transplante de Medula Óssea (TMO) no HCFMUSP, hospital universitário terciário de 2200 leitos em São Paulo. A unidade de hematologia está localizada no Instituto Central e à época do estudo possuía 21 leitos, dos quais 18 leitos em 9 quartos eram destinados para TCTH. O setor apresentava sistema de ventilação com filtro HEPA (*high efficiency particulate air filter*) e pressão positiva. Havia uma pia para higiene de mãos na área comum da unidade e um dispensador de álcool-gel em cada quarto. Os quartos possuíam dois leitos cada (à exceção de um quarto de isolamento com apenas um leito) com materiais de uso individual e banheiro compartilhado.

ROTINA DO SERVIÇO DE TMO DO HCFMUSP

O serviço de TMO no HCFMUSP realiza cerca de 10 a 12 TCTH por mês, entre alogênicos e autólogos. Durante o período de neutropenia até a enxertia neutrofílica todos os pacientes recebiam profilaxia antimicrobiana antibacteriana com levofloxacino. A profilaxia para *Pneumocystis jirovecii* era realizada com sulfametoxazol-trimetoprim até o D-1 e reintroduzida após a enxertia neutrofílica e a profilaxia antifúngica era realizada com fluconazol em conjunto com vigilância com coleta seriada de galactomanana sérica.

A partir de agosto de 2009 foi padronizado na unidade de TMO o banho diário dos pacientes com uso de digluconato de clorexidina 2%⁵⁶. Desde 2012, é realizada vigilância ativa para microorganismos de interesse epidemiológico definidos pela Subcomissão de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH) do HCFMUSP: *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, *Enterococcus* sp. Resistente à vancomicina, *Acinetobacter* sp. resistente aos carbapenêmicos e Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos.

As culturas de vigilância são realizadas semanalmente a partir de swab retal ou cultura de fezes (nos pacientes neutropênicos graves <100 células/mm³) até a positividade ou até o término da internação (quando negativa). Conforme orientação da SCIH, de acordo com a situação epidemiológica ou disponibilidade de insumos da época, houve períodos de coleta adicional de mais de um sítio (swab axilar/orofaringe/virilha) e de vigilância ativa em outros setores (p.ex., Hospital-Dia). Para a identificação de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, o material coletado é enviado ao laboratório de microbiologia do HCFMUSP e é semeado em meio de cultura enriquecido com carbapenêmico (meropenem a 1 µg/ml). A identificação dos microorganismos e teste de sensibilidade a antimicrobianos das culturas de vigilância assim como das culturas coletadas na suspeita de infecção é realizada por sistema automatizado VITEK 2[®] (Biomérieux, França).

São instituídas medidas de precaução de contato até a alta hospitalar nos pacientes com culturas de vigilância ou de material clínico positivas para quaisquer desses microorganismos, que são alocados em leito individual e com uso de aventais de isolamento de tecido e luvas de procedimento por todos os profissionais de saúde envolvidos no cuidado destes pacientes.

DESENHO DO ESTUDO

O histórico desde a primeira detecção de KRC na Unidade de TMO-HCFMUSP e as análises realizadas durante o período do estudo estão representadas na figura 2.

Figura 2 – Linha do tempo do histórico desde a detecção de KRC na Unidade TCTH-HCFMUSP e descrição das análises realizadas. Legenda: KRC – *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos; CIM Concentração Inibitória Mínima; PCR Reação em cadeia da polimerase; RT-PCR Reação em cadeia da polimerase em tempo real; TCTH Transplante de células tronco hematopoiéticas; LIM Laboratório de Investigação Médica

3.1 DADOS CLÍNICOS

Todos os dados clínicos e laboratoriais foram coletados a partir do acesso ao sistema de laboratório HCMED e prontuários físico e eletrônico (sistema SI3) e registrados em ficha (APÊNDICE A) criada utilizando ferramentas eletrônicas REDCap (*Research Electronic Data Capture*) hospedadas pelo HCFMUSP⁶⁷. Esses registros foram posteriormente exportados em formato de arquivo .css, convertidos para .xls e incorporados aos dados de transplante e das amostras microbiológicas para criação de banco de dados do estudo.

3.1.1 Dados relacionados ao transplante

- Doença de base: leucemias agudas, leucemias crônicas, linfoma, mieloma múltiplo, anemia aplásica e outros;
- Presença de comorbidades – foram registradas as doenças associadas dos pacientes e calculado o índice de comorbidade de Charlson⁶⁸.
- Estágio da doença neoplásica de base: ativo, remissão completa, remissão parcial, recaída ou resistente⁶⁹
- Histórico de internações nos últimos 6 meses (local, duração)
- Tipo de TCTH: alogênico (aparentado ou não aparentado) ou autólogo;
- Tempo após o TCTH
- Presença de Doença Enxerto contra o Hospedeiro (DECH), tipo e grau de DECH^{70,71}
- Uso de antimicrobianos nos últimos 3 meses

3.1.2 Dados relacionados à cultura da *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos

- Os isolados de KRC foram definidos como colonização (amostra coletada de *swab* de vigilância conforme protocolos da SCIH HCFMUSP) ou como infecção (cultura de amostra clínica).
- Infecção polimicrobiana (até duas bactérias identificadas na mesma hemocultura que a *K. pneumoniae*) .
- Dados laboratoriais da data da cultura: presença de neutropenia e gravidade da neutropenia (<500 céls./mm³ ou <100 céls./mm³)

3.1.3 Dados relacionados à infecção por *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos

- Sítio da infecção

O sítio de infecção foi definido segundo critérios estabelecidos pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC) para o diagnóstico de infecção⁷². O foco infeccioso foi classificado como pulmonar, urinário, abdominal, corrente sanguínea, pele e partes moles, osso/articulações e outros^{73,74}

Gravidade

- Presença de sepse ao diagnóstico da infecção e classificação da mesma se presente (sepse, sepse grave, choque séptico)⁷⁵
- Nos pacientes admitidos na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) foi calculado o índice de gravidade da doença utilizando o escore *Simplified Acute Physiology Score II* (SAPS II) à admissão na UTI⁷⁶. Os pacientes neutropênicos com infecção foram avaliados também de acordo com o escore MASCC⁷⁷

Tratamento da infecção

- Foram descritos os antimicrobianos utilizados no tratamento da infecção pela KRC (monoterapia x terapia combinada)
- Terapia adequada: utilização de pelo menos um antibiótico sensível (caracterizado pela sensibilidade no antibiograma) iniciado nas primeiras 48 horas da coleta do exame de cultura, na dose recomendada e ajustada quando necessário para função renal, e por tempo de tratamento adequado de acordo com o sítio de infecção.
- Terapia inadequada: cepa isolada resistente ao antibiótico, droga iniciada após 48 horas da coleta dos exames, ou dose, via ou tempo inadequados de tratamento^{78,79}.

Desfecho

Foram considerados como desfechos clínicos para análise de correlação: sobrevida em 14 dias da infecção (considerada relacionada ao evento),

sobrevida em 30 dias ou óbito. Foi avaliada também sobrevida até o D+100 do TCTH.

3.2 DADOS MICROBIOLÓGICOS

3.2.1 Amostras

Do total de 110 pacientes com culturas positivas para KRC, estavam disponíveis 60 isolados de 42 pacientes armazenados no banco de cepas do Laboratório de Investigação Médica de Protozoologia, Bacteriologia e Resistência Antimicrobiana – LIM-49. Todos os microorganismos foram isolados em amostras coletadas de pacientes da unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2015.

As amostras foram cultivadas em meio seletivo (MacConkey) e identificadas no LIM-54 pela técnica de espectometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF – Bruker, EUA). Os isolados foram armazenados em BHI - glicerol a -70°C.

Foi avaliado o perfil de sensibilidade a antimicrobianos por concentração inibitória mínima (CIM) em microdiluição em caldo de todos os isolados identificados como *Klebsiella pneumoniae* para confirmação de perfil de resistência a carbapenêmicos conforme Clinical Laboratory Standards Institute⁸⁰. e a colistina (CIM >2 mg/L) conforme Comitê Europeu para o Teste à Susceptibilidade Antimicrobiana⁸¹

Todas as amostras de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos foram submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação dos genes *bla*_{kpc}, *bla*_{ndm}, *mcr-1* e *bla*_{oxa-48}⁸²⁻⁸⁴. Amostras negativas pelo PCR *in house* para carbapenemase foram submetidas ao teste de PCR em tempo real (Cepheid^(R), EUA).

Dezessete amostras foram selecionadas para sequenciamento total do genoma bacteriano conforme os seguintes critérios: perfil eletroforético por análise de clonalidade; resistência a colistina em amostras de infecção; ou PCR negativo para gene *bla*_{KPC}.

3.2.1.1 Detecção de genes codificadores de KPC, OXA-48 e NDM e MCR-1

Extração de DNA

A extração de DNA das bactérias gram-negativas foi realizada utilizando o kit illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). A reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de gene codificador de KPC, OXA-48 e NDM foi realizada utilizando os iniciadores (*primers*) descritos abaixo:

Tabela 1 – Iniciadores utilizados para detecção de genes de resistência *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *mcr-1* por reação de cadeia de polimerase

Gene	Iniciador	Sequência (5´ - 3´)	Tamanho produto da reação	Anelamento (°C)	Ref.
<i>mcr-1</i>	Mcr1-F	CGGTCAGTCCGTTTGTTTC	309pb	53°C	Liu <i>et al.</i> ³⁶
	Mcr1-R	CTTGGTCGGTCTGTAGGG			
<i>bla</i> _{OXA-48}	Oxa48-F	TGTTTTTGGTGGCATCGAT	177pb	53°C	Monteiro <i>et al.</i> ⁸⁴
	Oxa48-R	GTAACAATGCTTGGTTCGC			
<i>bla</i> _{NDM}	NDMup-F	GAATGTCTGGCAGCACACTT	479pb	58°C	Chen <i>et al.</i> ⁸³
	NDMdw-R	TTGGCCTTGCTGTCTTGAT			
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F	ATGTCAGTGTATCGCCGTCT	893pc	54°C	Bradford <i>et al.</i> ⁸²
	KPC-R	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC			

O sequenciamento dos produtos de PCR amplificados de amostras positivas foi realizado utilizando o ABI 3730 DNA Analyser. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. As sequências foram analisadas pelo *software* BioEdit v.7.0.9.0 e comparadas com banco de dados disponível na internet (BLAST – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

3.2.1.2 Análise de clonalidade por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Para a verificação do perfil clonal dos isolados foi utilizado o método de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) onde os isolados de *Klebsiella*

pneumoniae foram semeados em ágar MacConkey e incubados em aerobiose a 35°C por 18 a 24 horas. Posteriormente foram repicados em caldo soja-tripticaseína (TSB) e incubados a 37°C por 24h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm durante 20 minutos e o sedimento foi ressuspensionado em 1ml de solução salina estéril e homogeneizados em agitador por 1 minuto. Após esse processo, a suspensão bacteriana foi transferida para microtubos de 2 ml previamente pesados. Essa suspensão foi centrifugada a 13000 rpm durante 30 segundos e o sobrenadante descartado. Esse procedimento foi repetido três vezes. O sedimento foi então pesado e ressuspensionado em EDTA (25 mM pH 8,0), para uma concentração final de massa bacteriana de 100 µg/µl. Desta suspensão, 25µl foram transferidos para um tubo de micro-centrífuga contendo 225µl de tampão TEN (EDTA 0,5M, pH 7,0; EDTA 0,5M pH 8,0; Trisma base 1M pH 7,0; Trisma base 1M pH 8,0; NaCl; N-lauril sarcosil; Brij 58; Deoxicolato de sódio), adicionado de 250 µl de agarose de baixo ponto de fusão a 2% (Sigma, EUA) e 20 µl de solução de lisozima (100 µg/ml) (Sigma EUA). Esta suspensão foi, então, transferida para os moldes e permaneceu por 30 minutos a 4°C, para que os blocos solidificassem. Após esta etapa, os blocos foram transferidos para uma placa de cultura de células de 24 poços, contendo 2 mL de tampão EC (EDTA 0,5M, pH 7,0; EDTA 0,5M pH 8,0; Trisma base 1M pH 7,0; Trisma base 1M pH 8,0; NaCl; N-lauril sarcosil; Brij 58; Deoxicolato de sódio) em cada poço e incubadas a 37°C por um período de cinco horas, sob agitação suave. Após a incubação, os blocos foram lavados com 2,5ml de tampão CHEF-TE para Gram-negativo (EDTA 0,5M pH 7,0; EDTA 0,5M pH 8,0; Trisma base 1M pH 7,0; Trisma base 1M pH 8,0), e a seguir incubados com 1 mL de tampão ES (EDTA 625 nM pH 9,3; N-lauril sarcosil 5%) adicionado de 50µL de solução de proteinase K (20mg/ml) (Invitrogen EUA) e incubados de 8h a 16h à temperatura de 50°C. Os blocos foram lavados com 2,5mL de tampão CHEF TE para Gram-negativo (EDTA 0,5M pH 7,0; EDTA 0,5M pH 8,0; Trisma base 1M pH 7,0; Trisma base 1M pH 8,0) com quatro lavagens com incubações de uma hora cada, e armazenados nesta solução até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese.

A digestão do DNA cromossômico foi realizada com a enzima de restrição FastDigest® BcuI (Thermo Fisher Scientific), que reconhece e cliva

sequências de nucleotídeos que aparecem poucas vezes ao longo do DNA de *Klebsiella pneumoniae* (12 a 20 sítios de restrição). Para o tratamento com enzimas de restrição, um bloco de agarose de cada amostra foi transferido para uma placa de cultura de células de 96 poços contendo 200 µL de tampão DNS (Trisma base 1M pH 8,0; Cloreto de Magnésio 1M). A seguir, o mesmo tampão foi retirado e novamente foram adicionados 200 µL do mesmo, o bloco foi incubado a temperatura ambiente durante uma hora. Este processo foi repetido quatro vezes. Após este período, o tampão DNS (Trisma base 1M pH 8,0; Cloreto de Magnésio 1M) foi substituído por 100 µL de uma solução contendo tampão FastDigest® 1x e 1µL da enzima FastDigest® BcuI e, em seguida, incubados por 5 minutos a 37°C.

A eletroforese em campo pulsado foi realizada em gel de agarose a 1% (sigma, EUA) em TBE 0,5x (90mM Tris, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA [Amersham Pharmacia Biotech, EUA]), no equipamento CHEF DRII System (BIO-RAD, EUA) com intervalos de tempo de pulso de 5 a 60 segundos por 20 horas, ângulo de 120°, temperatura de 14°C e voltagem de 6,0 volts/cm⁸⁵

A seguir, os géis foram corados com solução aquosa contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Sigma, EUA) e fotografados sob luz ultravioleta. Foi utilizado como padrão de peso molecular Lambda DNA ladder PFG (New England Biolabs, Inc., EUA).

Os perfis eletroforéticos gerados foram agrupados utilizando-se o software de bioinformática Bionumerics versão 7.6 (Applied Maths). Fragmentos de DNA foram manualmente verificados e normalizados usando o peso Lambda Marker presente em cada gel. Uma tolerância de 1,5% e otimização de 1,5% foram utilizadas para a comparação de diferentes géis conforme sugerido por De Maio Carrilho⁸⁶. O agrupamento de clusters foi realizado e gerado um dendrograma pelo método de Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) e coeficiente Dice de similaridade. Para definir os PFT (Pulsed Field Type) e subtipos encontrados os isolados com similaridade <80% foram considerados diferentes PFT.

3.2.1.3 Sequenciamento do Genoma Completo Bacteriano (SGC)

Foi realizado Sequenciamento do Genoma Completo Bacteriano dos isolados selecionados utilizando MiSeq IlluminaTM (Illumina, San Diego, EUA). A montagem *de novo* do genoma foi realizada utilizando o programa VelvetOptimiser v2.2.5 (Victorian Bioinformatics Consortium, Australia). Os contigs foram ordenados por Abacas v.1.3.1⁸⁷ utilizando a cepa de referência *Klebsiella pneumoniae* MGH78578 cujo genoma está disponível no sítio do *National Center for Biotechnology Information* (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). A anotação dos genomas foi realizada utilizando Prokka v1.1.1⁸⁸.

A tipagem molecular por *Multilocus Sequence Typing* foi analisada com a ferramenta *online* MLSTfinder⁶¹ e confirmada no banco de dados PubMLSTPasteur (<http://pubmlst.org>). O estudo de genes de resistência foi realizado utilizando a ferramenta Resfinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>)⁸⁹ e para os genes de virulência foi utilizada a ferramenta Virulence Factors of Pathogenic Database (VFDB)⁹⁰. Os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) foram identificados usando BWA, SAMtools e Genome Analysis Toolkit (GATK)^{91,92}. Todos os SNPs foram checados manualmente.

Os genomas sequenciados foram depositados no banco de dados DDBJ/EMBL/GenBank.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram digitalizados em base de dados EPI INFO 7 na sua versão 7.1.2 e realizada análise descritiva das características dos isolados e variáveis clínicas. Para as variáveis categóricas foi utilizado o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando necessário.

A regressão logística multivariada de *Forward Stepwise* foi utilizada para detectar fatores de risco independentes para colonização e infecção por *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e óbito, através da *Odds Ratio* (OR). Variáveis com valor de $p < 0,10$ foram incluídas no modelo de regressão logística. A análise de sobrevivência aos 30 dias foi realizada pelo método de Kaplan-Meier. O nível de significância utilizado foi de 5%. As

análises foram realizadas no Programa Epi Info 7[®] (CDC, Atlanta, EUA), SPSS[®] 20 (Chicago, IL, EUA) e GraphPad Prism 5[®] (San Diego, CA, EUA).

3.4 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi realizado respeitando os preceitos do Código de Helsinque em sua última versão, assim como a resolução 196/96 do Ministério da Saúde sobre Pesquisa Envolvendo Seres Humanos publicada em 10 de outubro de 1997. Foi avaliado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP em parecer consubstanciado nº 1.310.231 (APÊNDICE B) e, tendo em vista que o estudo foi baseado em dados secundários e na análise de isolados bacterianos do banco de cepas da instituição, não foi considerada necessária a aplicação de termo de consentimento livre e esclarecido.

4. Resultados

4. RESULTADOS

No período de 2008-15 foram realizados 962 TCTH no serviço de TMO do HCFMUSP. O primeiro caso de colonização identificado na unidade ocorreu em 2008 e a primeira infecção no ano seguinte. A partir de 2012, a SCIH-HCFMUSP iniciou a vigilância ativa de colonização por KRC. Após a implementação da realização de culturas de vigilância, houve aumento no número de culturas positivas para KRC de 2 (2011) para 42 (2012) enquanto o número de TCTH realizados no serviço permaneceu estável.

O gráfico abaixo representa o número de casos de colonização e infecção na unidade de TMO nos anos 2008-15.

Gráfico 1 – Número de colonizações e infecções por *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (KRC) x Número de transplantes de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) no período 2008-15 no HCFMUSP

Legenda: No. de TCTH – número absoluto de transplantes realizados (valores correspondentes no eixo vertical da esquerda) KRC+ - número de culturas positivas para *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (valores correspondentes no eixo vertical da direita) * a partir de 2012 foi iniciada vigilância ativa de colonização por KRC

4.1 COORTE DE PACIENTES NÃO-COLONIZADOS E COLONIZAÇÕES/INFECÇÕES POR KRC DOS PACIENTES SUBMETIDOS A TCTH

No período de 2012-2015 foram realizados um total de 569 transplantes, dos quais foram identificados 105 pacientes colonizados/infectados por KRC.

Os dados dos pacientes com infecção e colonização por KRC foram coletados e tabulados em ficha eletrônica através do REDCap (ANEXO B). Os dados referentes aos pacientes não-colonizados da coorte foi obtido a partir de banco de dados do serviço.

4.2 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA ATÉ D+100 PÓS-TCTH DOS PACIENTES COLONIZADOS E INFECTADOS POR KRC

A análise de sobrevivência da coorte geral de pacientes submetidos a TCTH, de pacientes com colonização e com infecção por KRC foi realizada utilizando a curva de sobrevida de Kaplan-Meier até o D+100 após o TCTH conforme gráfico 2.

Gráfico 2 – Curva de sobrevida de Kaplan-Meier até o D+100 pós-transplante comparando a coorte geral (NC) de pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) com pacientes colonizados (C) por *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (KRC) e pacientes com infecção (I) por KRC no HCFMUSP no período 2012-15

Legenda: TCTH – Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas; NC – pacientes não colonizados por *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (KRC); C – pacientes colonizados por KRC; I – pacientes com infecção por KRC

A sobrevida no D+100 pós-TCTH foi de 85.9% nos pacientes não-colonizados por KRC e foi significativamente menor nos pacientes colonizados (75.4% $p = 0.02$) e infectados por KRC (35.7% $p < 0.001$).

4.3 COLONIZAÇÃO POR KRC NA COORTE DE PACIENTES SUBMETIDOS A TCTH

Os dados dos 75 pacientes com colonização foram comparados com os 30 pacientes que apresentaram infecção por KRC e estão apresentados na tabela 2. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto aos dados demográficos e clínicos à exceção de neutropenia no momento da positividade de cultura (OR=1,63 IC 1,28-2,08 $p < 0.0001$) e evolução para internação em terapia intensiva (OR 2,75 IC 1,54-4,9 $p < 0,0001$).

Tabela 2 – Descrição de dados demográficos e clínicos dos 105 pacientes com colonização e infecção por KRC nos pacientes submetidos a TCTH do HCFMUSP 2012-15

Característica	Colonizações (N=75)	Infecções (N=30)	
Sexo feminino	38 (50,7%)	16 (53,3%)	
Idade (anos)	15-71 (mediana 45)	15-68 (mediana 42,5)	
Doença de base			
LMA	12 (16%)	6 (20%)	
Linfoma não Hodgkin	10 (13,3%)	5 (16,7%)	
LLA	3 (4%)	5 (16,7%)	
Anemia Aplásica	8 (10,7%)	3 (10%)	
Mieloma Múltiplo	18 (24%)	3 (10%)	
Linfoma de Hodgkin	8 (10,7%)	2 (6,7%)	
SMD	3 (4%)	3 (10%)	
LMC	8 (10,7%)	1 (3,3%)	
Mielofibrose	2 (2,7%)	1 (3,3%)	
Outros	3 (4%)	1 (3,3%)	
Tipo de Transplante			
Autólogo	37 (49,3%)	10 (33,3%)	
Alogênico aparentado	29 (38,7%)	11 (36,7%)	
Alogênico não aparentado	3 (5,3%)	6 (20%)	
Haploidêmico	1 (1,3%)	1 (3,3%)	
Não transplantou	4 (5,3%)	2 (6,7%)	
Internação prévia nos 6 meses anteriores ao TCTH	53 (71,6%)	21 (70%)	
Uso de antibioticoterapia nos 3 meses anteriores ao TCTH	68 (90,6%)	25 (83,3%)	
Levofloxacino			
Piperacilina-tazobactam	64 (85,3%)	25 (83,3%)	
Cefalosporina antipseudomonas	27 (36%)	11 (36,7%)	
Carbapenêmicos	10 (13,3%)	8 (26,7%)	
Polimixinas	42 (56%)	16 (53,3%)	
Aminoglicosídeos	20 (26,7%)	6 (20%)	
	4 (5,3%)	-	
Dias da internação até cultura KRC (Mediana)	15 (1-90)	18 (-11 a 35)	
Charlson	Mediana 2 (0-9)	Mediana 2 (0-4)	
Nutrição parenteral	8 (10,7%)	4 (13,3%)	
Mucosite (qualquer grau)	36 (48%)	20 (66,7%)	
<u>Neutropenia (<500/mm³) no momento da cultura positiva</u>	<u>33 (44%)</u>	<u>26 (86,7%)</u>	p<0.0001
<u>Admissão em UTI</u>	<u>8 (10,67%)</u>	<u>18 (60%)</u>	p<0.0001

Legenda: KRC *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos; TCTH Transplante de células tronco hematopoiéticas; LMA Leucemia mieloide aguda; LLA Leucemia linfóide aguda; SMD Síndrome mielodisplásica

Após a colonização, excluindo as infecções documentadas por KRC, 27 pacientes apresentaram episódio de neutropenia febril. Destes pacientes, 23 receberam antibioticoterapia com esquema empírico incluindo colistina (16 nas primeiras 48 horas) com 11 (42.3%) pacientes evoluindo com insuficiência renal aguda (clearance estimado <50ml/min), 4 dos quais necessitaram terapia renal substitutiva (17,4%).

4.4 INFECÇÕES POR KRC NA COORTE DE PACIENTES SUBMETIDOS A TCTH

Trinta pacientes submetidos a TCTH no HCFMUSP apresentaram infecção por KRC no período de 2012 a 2015.

Os dados clínicos e de tratamento dos pacientes estão descritos na tabela 3.

A maioria dos pacientes com infecção por KRC foi submetida a TCTH alogênico (18/30) e os principais diagnósticos de base foram Leucemias agudas (6/30 LMA e 5/30 LLA) e Linfoma Não-Hodgkin (5/30). Dentre os transplantes alogênicos, a fonte de células-tronco principal foi periférica (11/30). Cinco pacientes apresentavam DECH no momento da infecção por KRC. As comorbidades mais frequentes foram: HAS (8/30), asma (2/30), DM (1/30), hepatopatia (1/30).

A maior parte dos pacientes com infecção por KRC teve pelo menos uma internação prévia nos últimos 6 meses antes do episódio infeccioso (21/30). A maioria (23/30 pacientes) havia feito uso de antibioticoterapia por pelo menos 7 dias nos 3 meses que antecederam a infecção (25 utilizaram quinolonas; 11 piperacilina-tazobactam; 8 cefalosporina com atividade antipseudomonas; 16 carbapenêmicos e 6 polimixinas). A maioria dos pacientes (24/30) apresentava neutropenia grave (<100 céls/mm³) no momento da infecção. Quatorze pacientes (46,6%) eram previamente colonizados por KRC antes do episódio de infecção.

Tabela 3 – Descrição de dados clínicos e do tratamento de 30 infecções por KRC em pacientes submetidos a TCTH do HCFMUSP 2012-15

Característica	N (30)
Colonização prévia	14 (46,67%)
Neutropenia na data da cultura	26 (86,67%)
<500/mm ³	2 (6,7%)
<100/mm ³	24 (80%)
Tempo da internação à infecção	Mediana 19 (-11 a 49 dias)
Sítio da Infecção	
Infecção de corrente sanguínea (ICS)	23 (76,7%)
ITU	2 (6,7%)
Pulmonar	1 (3,3%)
Sinusite	1 (3,3%)
ICS secundária foco cutâneo	2 (6,7%)
ICS secundária foco TGI	1 (3,3%)
Coinfecção com outro agente	12 (40%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 (16,7%)
<i>Serratia marcescens</i>	1 (3,3%)
<i>Enterococcus faecium</i>	1 (3,3%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 (3,3%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 (3,3%)
<i>Mucor</i> sp.	1 (3,3%)
<i>Aspergillus</i> sp. provável	1 (3,3%)
CMV	1 (3,3%)
Escore de MASCC	Mediana 20 (6-25)
Evolução grave (indicada terapia intensiva)	18 (60%)
SAPS II	Mediana 55 (43-90)
Transferência para UTI	11
Terapia antimicrobiana combinada	27 (90%)
Meropenem	28 (93,3%)
Amicacina	17 (56,7%)
Polimixina	26 (86,7%)
Tigeciclina	9 (30%)
Fosfomicina	1 (3,3%)
Terapia antimicrobiana adequada	17 (56,7%)
Desfecho clínico	
Óbito <14 dias	11 (36,7%)
Óbito em 30 dias	19 (63,3%)
Sobrevida >30 dias	11 (36,7%)

Legenda: KRC *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos; TCTH Transplante de células tronco hematopoiéticas; ICS infecção de corrente sanguínea; ITU infecção do trato urinário; TGI trato gastrointestinal; sp. espécie; CMV Citomegalovírus; MASCC *Multinational Association of Supportive Care in Cancer*; SAPS Simplified Acute Physiology Score; UTI unidade de terapia intensiva

O principal sítio de infecção foi ICS (23/30, 76.7%) e a coinfeção com outro agente ocorreu em 12 pacientes, dos quais 5 infecções concomitantes por *Pseudomonas aeruginosa*.

Dezoito pacientes evoluíram com piora clínica tendo sido indicada transferência para unidade de terapia intensiva. Destes pacientes, onze foram internados em UTI e sete evoluíram para óbito antes dessa transferência.

A maioria dos pacientes (27/30) utilizou terapia antimicrobiana combinada e a combinação mais utilizada foi de meropenem e polimixina (25/30 pacientes). Na avaliação da adequação da terapia, 17 (56.7%) foram considerados adequados (pelo menos um antibiótico ativo no antibiograma iniciado em <48h da infecção por tempo adequado de tratamento). Dezenove pacientes evoluíram com insuficiência renal aguda com *clearance* de creatinina estimado <50ml/min, quatro dos quais necessitaram terapia substitutiva renal.

Dos 30 pacientes, 19 (63,3%) foram a óbito no período avaliado, sendo que 11 em <14 dias da data da infecção (36,7%) e 8 (26,7%) em 30 dias da infecção.

4.4.1 Análise de fatores associados a óbito em 14 dias

Foram analisadas associações de fatores a óbito em 14 dias após infecção por KRC. A tabela abaixo descreve as características associadas a óbito na análise bivariada.

Na análise multivariada, apenas permaneceu estatisticamente significativa a associação com sexo masculino (OR 0.09 IC0.009-0.83 p=0.03).

Tabela 4 – Fatores associados a óbito em 14 dias após infecção por KRC em 30 pacientes submetidos a TCTH no HCFMUSP 2012-15

Característica	RR (IC, p)
Sexo masculino	0,51 (0,28-0,92, p=0,02)
Idade >60 anos	1,33 (0,57-3,11, p=0,64)
Tipo de transplante alogênico	0,87 (0,5-1,51, p=0,70)
Medula óssea como fonte de células tronco	2,62 (0,79-8,7, p=0,06)
Neutropenia	1,28 (0,64-2,32, p=1)
Mucosite	1,17 (0,68-2,00, p=0,70)
DECH	0,95 (0,81-1,11, p=1)
Colonização prévia por KRC	0,97 (0,56-1,67, p=1)
Co-infecção com outro agente	1,14 (0,64-2,04, p=0,71)
Uso de polimixina	0,36 (0,06-2,00, p=0,12)
Terapia antimicrobiana inadequada	1,31 (0,73-2,36, p=0,45)
Infecção por KRC colistina-resistente	1,25 (0,67-2,33, p=0,69)
Insuficiência renal aguda pós-infecção	1,26 (0,74-2,12, p=0,47)
Terapia substitutiva renal	0,82 (0,43-1,56, p=1)
Admissão em UTI	2,57 (1,44-4,59, p<0,001)

Legenda: KRC *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos; TCTH transplante de células tronco hematopoiéticas; UTI unidade de terapia intensiva

4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os 60 isolados disponíveis no Banco de cepas do LIM-54 foram identificados por MALDI-TOF e determinadas as concentrações inibitórias mínimas para carbapenêmicos. Todos os isolados foram confirmados como *Klebsiella pneumoniae* e apresentavam resistência a carbapenêmicos (CIM de meropenem 4 a >16µg/ml e imipenem 4 a >16µg/ml).

4.5.1 Resultados de PCR para genes codificadores de carbapenemases *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{NDM}

A *bla*_{KPC} foi a carbapenemase mais frequente (55/60) nas amostras do banco de cepas: 24 isolados foram detectados por PCR *in house*, 25 foram detectados por RT-PCR Cepheid® e 8 por SGC. Não foi detectada nenhuma amostra *bla*_{OXA-48}+

Três isolados, provenientes de amostras de infecção dos anos de 2012, 2013 e 2014, foram positivos para *bla*_{kpc}+ e *bla*_{ndm}+. Desses três pacientes, um foi a óbito em 14 dias da infecção e um em 30 dias da infecção.

4.5.2 Perfis eletroforéticos entre os isolados de KRC

Foi realizada Eletroforese em campo pulsado de todos os isolados de *Klebsiella pneumoniae* armazenado no banco de cepas do LIM/49. O dendrograma gerado identificou 17 diferentes *pulsed-field types* (PFT) de colonização e infecção. Não estavam disponíveis no banco de cepas amostras pareadas de colonização e infecção do mesmo paciente para análise de clonalidade.

A figura abaixo apresenta o dendrograma de todas as cepas de colonização e infecção por *Klebsiella pneumoniae*. Estão representados também os resultados de PCR para as carbapenemases estudadas e *mcr-1*, data de isolamento, sítio de origem da amostra (colonização ou infecção) e perfil de sensibilidade a colistina. O mais frequente PFT foi o *cluster* K com 19 isolados (11 provenientes de infecção) que esteve presente em isolados dos anos de 2012, 2013 e 2014.

Figura 3 – Dendrograma dos 60 isolados de 31 colonizações e 29 infecções *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos dos pacientes submetidos a TCTH no HCFMUSP disponíveis no banco de cepas do LIM-49 - HCFMUSP

Legenda: SpeI enzima de restrição utilizada; PFT *Pulse-field type*; ST *Sequence type*; R resistente; S susceptível

Foi gerado outro dendrograma a partir dos isolados provenientes de amostras coletadas de ICS, com identificação de 12 diferentes PFT. O principal PFT foi o *cluster* B que esteve presente em amostras dos anos de 2012 e 2014.

Figura 4 – Dendrograma dos 29 isolados de infecção por *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos dos pacientes submetidos a TCTH no HCFMUSP disponíveis no banco de cepas do LIM-49/HCFMUSP

Legenda: Spel enzima de restrição utilizada; PFT Pulse-field type; ST Sequence type; R resistente; S susceptível

4.5.3 Resultados do Sequenciamento do Genoma Completo Bacteriano

Foram selecionados 17 isolados bacterianos para SGC.

A tipagem molecular por MLST identificou 10 cepas pertencentes ao ST340, 4 cepas ao ST11, 2 ao ST437 (pertencentes ao Complexo Clonal CC258) e 1 ao ST16.

Do total de 55/60 isolados em que foi detectado gene *bla*_{KPC}, 6 eram positivos no exame de PCR para *bla*_{KPC}, e confirmados pelo SGC. Dos 10 isolados negativos para *bla*_{KPC} por PCR, 7 apresentavam o gene por SGC.

Foram frequentes as mutações em porinas, principalmente *ompk36* e *ompk37*. As sequências amplificadas foram analisadas com a ferramenta RESFINDER e todos os isolados sequenciados apresentavam genes de resistência a múltiplas classes de antibióticos.

Todos os isolados sequenciados apresentavam combinação de *replicons* pertencentes a plasmídeos identificados por meio da ferramenta *Plasmidfinder*.

Quanto à análise de virulência, as sequências foram comparadas com o banco de dados da ferramenta VFDB: a maioria dos isolados sequenciados apresentavam genes para aquisição de ferro relacionados à enterobactina e de adesão bacteriana e formação de biofilme com genes relacionados às *fimbriae* tipo 1 e tipo 3.

As análises por SGC para genes de resistência a antimicrobianos, virulência e pesquisa de plasmídeos, bem como a tipagem molecular por MLST estão representadas nas figuras 6-9, abaixo:

ISOLADO				Betalactamases												Aminoglicosídeos								Fluoroquinolonas						Fosfomicina	Cloranfenicol		Sulfonamida		Trimetoprima				Tetraciclinas									
				COL/INF	PCR NDM	PCR Oxa48	PCR MCR-1	blaKPC-2	blaSHV-11	blaSHV-36	blaSHV-182	blaOXA-1	blaOXA-2	blaOXA-9	blaCTX-M-2	blaCTX-M-8	blaCTX-M-15	blaTEM-1B	blaTEM-1A	aac(6')/lb-cr	aadA2	aph(3')-Ia	aac(3)-IIId	strB	strA	aac(3)-IIa	aacA4	aac(6')/lb-cr	aph(3')-Via	oxqA	oxqB	QnrB1	QnrB19	QnrB66	fosA	catA1	catB3	sul1	sul2	dfrA30	dfrA12	dfrA14	tet(A)	tet(B)	tet(D)			
1277	COL	NEG	NEG	NEG	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
1422	COL	NEG	NEG	NEG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1		
1484	COL	NEG	NEG	NEG	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1		
1563	COL	NEG	NEG	NEG	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	
2026	COL	NEG	NEG	NEG	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2162	COL	NEG	NEG	NEG	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
4303	COL	NEG	NEG	NEG	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1			
4449	INF	NEG	NEG	POS	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
1202	INF	NEG	NEG	NEG	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1			
1411	INF	POS	NEG	NEG	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0			
1421	INF	NEG	NEG	POS	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0			
1427	INF	NEG	NEG	NEG	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0			
1478	INF	NEG	NEG	NEG	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1			
1581	INF	POS	NEG	NEG	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1			
4223	INF	NEG	NEG	NEG	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0				
4290	INF	NEG	NEG	NEG	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0				
4301	INF	POS	NEG	NEG	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

Figura 5 – Análise por PCR para *bla*NDM, *bla*OXA-48 e *mcr-1* e Sequenciamento do Genoma Completo Bacteriano utilizando ferramenta *RESFINDER* para pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos de 17 isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos do banco de cepas de pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas do HCFMUSP. Os quadrados hachurados em cinza com número 1 representam gene presente pelo sequenciamento genômico completo. Quadrados em branco com número 0 representam gene não detectado. Legenda: ST Sequence Type, COL colonização, INF infecção

		Mutações Porinas		PlasmidFinder (Plasmídeos)																MLST	GeneBank			
ISOLADO	COL/INF	ompK36	ompK37	Col(MG31)	Col(R6K)	ColR6AI	IncC	IncFIA(H1)	IncFIB(KPHS1)	IncFIB(pQII)	IncFIB(pQII)	IncFIB(K)	IncFII(pCRY)	IncH1B(pNDM-Mar)	IncH2A	IncH2B	IncH2C	IncH2D	IncH2E	IncH2F	IncH2G	IncH2H	ST	Numero de Acesso
12771	COL	-	D49S, L59V, A183, T184, InelSP, G188T, F188Y, V202L, F207Y, A217S, T222L, D223G, N226, Q227, InelS, Q227K, L229A, E232R, H235N, A280V, N304E, R345H, S346N	I70M, I128M, N230G, M233Q, M233, T234, InelHYTH, Q235E, E244D, N274S, D275T, D275, G276, InelSSTNGG, V277I																		437	COJID000000000	
1422	COL	-	D49S, L59V, A183, T184, InelSP, G188T, F188Y, V202L, F207Y, A217S, T222L, D223G, N226, Q227, InelS, Q227K, L229A, E232R, H235N, A280V, N304E, R345H, S346N	I70M, I128M, N230G, M233Q, M233, T234, InelHYTH, Q235E, E244D, N274S, D275T, D275, G276, InelSSTNGG, V277I																		340	COG000000000	
1484	COL	-	D49S, L59V, A183, T184, InelSP, G188T, F188Y, V202L, F207Y, A217S, T222L, D223G, N226, Q227, InelS, Q227K, L229A, E232R, H235N, A280V, N304E, R345H, S346N	I70M, I128M, N230G, M233Q, M233, T234, InelHYTH, Q235E, E244D, N274S, D275T, D275, G276, InelSSTNGG, V277I																		340	COB000000000	
1563	COL	-	gene interrompido	I70M, I128M, N230G, M233Q, M233, T234, InelHYTH, Q235E, E244D, N274S, D275T, D275, G276, InelSSTNGG, V277I																			340	COF000000000
2026	COL	-	D49S, L59V, A183, T184, InelSP, G188T, F188Y, V202L, F207Y, A217S, T222L, D223G, N226, Q227, InelS, Q227K, L229A, E232R, H235N, A280V, N304E, R345H, S346N	I70M, I128M, N230G, M233Q, M233, T234, InelHYTH, Q235E, E244D, N274S, D275T, D275, G276, InelSSTNGG, V277I																		11	COE000000000	
2162	COL	-	D49S, L59V, A183, T184, InelSP, G188T, F188Y, V202L, F207Y, A217S, T222L, D223G, N226, Q227, InelS, Q227K, L229A, E232R, H235N, A280V, N304E, R345H, S346N	I70M, I128M, N230G, M233Q, M233, T234, InelHYTH, Q235E, E244D, N274S, D275T, D275, G276, InelSSTNGG, V277I																		11	COG000000000	
4303	COL	-	gene interrompido	I70M, I128M, N230G, M233Q, M233Q, Q235E, T238R, N237Y, R238K, M233, T234, InelHYTH, E244D, N274S, D275T, V277I, D275, G276, InelSSTNGG																			340	COH000000000
4449	INF	Q288, del	D49S, L59V, G133, G134, InelGD, A190W, L191S, V202L, F207Y, A217S, N218H, D224E, Q227S, L228V, L229, L229, InelP, L229A, E232R, H235N, T254S, A280V, N304E, N304, G305, InelR, D340E, S345D, S346K	I70M, I128M, T261A																			16	NEIT000000000
1202	INF	-	D49S, L59V, A183, T184, InelSP, G188T, F188Y, V202L, F207Y, A217S, T222L, D223G, N226, Q227, InelS, Q227K, L229A, E232R, H235N, A280V, N304E, R345H, S346N	I70M, I128M, N230G, M233Q, M233, T234, InelHYTH, Q235E, E244D, N274S, D275T, D275, G276, InelSSTNGG, V277I																		340	COH200000000	
1411	INF	-	D49S, L59V, G133D, A183, T184, InelSP, G188T, F188Y, V202L, F207Y, A217S, T222L, D223G, N226, Q227, InelS, Q227K, L229A, E232R, H235N, A280V, N304E, R345H, S346N	I70M, I128M, N230G, M233Q, M233, T234, InelHYTH, Q235E, E244D, N274S, D275T, D275, G276, InelSSTNGG, V277I																		340	COU000000000	
1421	INF	-	D49S, L59V, A183, T184, InelSP, G188T, F188Y, V202L, F207Y, A217S, T222L, D223G, N226, Q227, InelS, Q227K, L229A, E232R, H235N, A280V, N304E, R345H, S346N	I70M, I128M, N230G, M233Q, M233, T234, InelHYTH, Q235E, E244D, N274S, D275T, D275, G276, InelSSTNGG, V277I																		437	COH000000000	
1427	INF	-	SR, L104del, D49S, L59V, A180, T181, InelSP, G188T, F188Y, V202L, F207Y, A217S, T222L, T223G, N226, Q227, InelS, Q227K, L229A, E232R, H235N, A280V, N304E, R345H, S346N	I70M, I128M, N230G, M233Q, M233, T234, InelHYTH, Q235E, E244D, N274S, D275T, D275, G276, InelSSTNGG, V277I																		11	COH000000000	
1478	INF	-	D49S, L59V, A183, T184, InelSP, G188T, F188Y, V202L, F207Y, A217S, T222L, D223G, N226, Q227, InelS, Q227K, L229A, E232R, H235N, A280V, N304E, R345H, S346N	I70M, I128M, N230G, M233Q, M233, T234, InelHYTH, Q235E, E244D, N274S, D275T, D275, G276, InelSSTNGG, V277I																		340	COI000000000	
1581	INF	-	D49S, L59V, A183, T184, InelSP, G188T, F188Y, V202L, F207Y, A217S, T222L, D223G, N226, Q227, InelS, Q227K, L229A, E232R, H235N, A280V, N304E, R345H, S346N	I70M, I128M, N230G, M233Q, M233, T234, InelHYTH, Q235E, E244D, N274S, D275T, D275, G276, InelSSTNGG, V277I																		340	COJ000000000	
4223	INF	-	L59V, A190W, L191S, V202L, F207Y, A217S, N218H, D224E, Q227S, L228V, L229, L229, InelP, L229A, E232R, H235N, T254S, A280V, N304R, L304, E305, InelE, S346N	I70M, I128M, T261A																			340	COUG000000000
4290	INF	-	D49S, L59V, G132, G133, InelGD, A183, T184, InelSP, F188Y, G188T, V202L, F207Y, A217S, T222L, D223G, N226, Q227, InelS, Q227K, L229A, E232R, H235N, A280V, N304E, R345H, S346N	I70M, I128M, N230G, M233Q, M233, T234, InelHYTH, Q235E, E244D, N274S, D275T, D275, G276, InelSSTNGG, V277I																		11	COIA000000000	
4301	INF	-	gene interrompido	I70M, I128M, N230G, Q233, T234, InelHYTH, Q235E, T238R, N237Y, R238K, E244D, N274S, T275, G276, InelSSTNGG, V277I																			340	UABZC000000000

Figura 6 – Análise por sequenciamento genômico completo de mutações de porina, plasmídeos e *Multilocus sequence typing* de 17 isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos do banco de cepas de pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas do HCFMUSP. Sinal de hífen – representa ausência de mutações detectadas. Os quadrados hachurados em cinza representam gene presente pelo sequenciamento genômico completo. Quadrados em branco representam gene não detectado. Legenda: ST *Sequence Type*, COL colonização, INF infecção

	ST	COL/INF	Fimbriae and Pili																		Bomba de Efluxo		Toxina - Colibactina																											
			fimA	fimB	fimC	fimD	fimE	fimF	fimG	fimH	fimI	fimK	mrkA	mrkB	mrkC	mrkD	mrkF	mrkH	mrkI	mrkJ	stbA	stbB	stbC	stbD	stbE	pilU	acrA	acrB	clbA	clbB	clbC	clbD	clbE	clbF	clbG	clbH	clbI	clbJ	clbK	clbL	clbM	clbN	clbO	clbP	clbQ	clbS				
ISOLADO	1277	437	COL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	1484	340	COL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1563	340	COL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2026	11	COL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
	2162	11	COL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
	4303	340	COL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1202	340	INF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1411	340	INF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1421	437	INF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1422	340	INF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1427	11	INF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
	1478	340	INF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1581	340	INF	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4223	340	INF	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
	4290	11	INF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	4301	340	INF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4449	16	INF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 7 - Análise por sequenciamento genômico completo de genes de virulência para adesão, toxina, protease, cápsula e bomba de efluxo de 17 isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos do banco de cepas de pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas do HCFMUSP. Os quadrados hachurados em cinza com número 1 representam gene presente pelo sequenciamento genômico completo Quadrados em branco com número 0 representam gene não detectado. Legenda: ST Sequence Type, COL colonização, INF infecção

4.6 INFECÇÃO POR KRC RESISTENTE À COLISTINA

Em toda a coorte de pacientes submetidos a TCTH no período, foram identificadas doze infecções por KRC resistente à colistina (11 infecções de corrente sanguínea e 1 infecção de trato urinário) em onze pacientes. Os dados dos pacientes estão descritos na tabela abaixo. Nove dos pacientes apresentavam neutropenia grave (<100 neutrófilos/mm³) no momento da infecção (mediana de dias entre internação e infecção: 19 dias, -2 a 70 dias). Cinco pacientes apresentavam infecção concomitante com outro patógeno (2 *Pseudomonas aeruginosa*, 1 *Serratia marcescens*, 1 *Aspergillus* sp., 1 Citomegalovírus).

Tabela 5 - Dados demográficos, clínicos e de tratamento de 12 casos de infecções por KRC resistente à colistina em coorte de pacientes submetidos a TCTH no HCFMUSP

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Dça base	Tipo TCTH	Data infecção	Sítio Infecção	Neutropenia (S/N)	Esquema antimicrobiano empírico inicial	Esquema antimicrobiano final	Coinfecção	Resultado
A	feminino	48	LMA	Pre-Alogênico	Jan-11	ICS	S	Meropenem + Colistina	Meropenem + Amicacina	<i>P. aeruginosa</i>	Óbito em 14 dias
B	masculino	62	Linfoma	Autólogo	Jun-12	ICS	S	Meropenem + Colistina	Meropenem + Amicacina + Tigeciclina	CMV	Óbito
C	masculino	34	LMA	Alogênico	Out-12	ICS	S	Meropenem + Colistina + Amicacina	Meropenem + Amicacina + Tigeciclina + Colistina		Sobrevida >30 dias
D	feminino	35	Linfoma	Autólogo	Nov-12	ICS	S	Meropenem + Colistina + Tigeciclina	Tigeciclina + Amicacina + Fosfomicina	<i>S. marcescens</i>	Óbito em 14 dias
E	feminino	33	LLA	Alogênico	Jan-13	ICS	S	Meropenem + Colistina	Meropenem + Amicacina + Colistina + Tigeciclina	<i>P. aeruginosa</i>	Óbito em 14 dias
F	feminino	39	LLA	Alogênico	Jul-13	ITU	N	Meropenem + Colistina	Meropenem + Amicacina	Aspergilose provável	Óbito em 14 dias
					Jun-13	ICS	N	Meropenem	Colistina		Sobrevive infecção
G	masculino	51	LMA	Alogênico	Jun-14	ICS	S	Meropenem + Colistina	Meropenem + Amicacina + Tigeciclina		Óbito
H	masculino	16	LLA	Alogênico	Jan-15	ICS secundária IPPM	S	Meropenem + Amicacina	Meropenem + Amicacina		Óbito em 14 dias
I	masculino	15	LLA	Alogênico	Mar-15	ICS	S	Meropenem + Colistina + Amicacina	Meropenem + Colistina + Amicacina + Tigeciclina		Óbito
J	masculino	53	Mieloma Múltiplo	Autólogo	Nov-15	ICS	S	Meropenem + Colistina + Tigeciclina	Meropenem + Amicacina		Sobrevida >30 dias
K	feminino	62	Mielofibrrose	Alogênico	Dez-15	ICS	S	Meropenem + Colistina + Amicacina	Meropenem + Colistina + Amicacina		Óbito em 14 dias

Legenda: KRC *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos; TCTH transplante de células tronco hematopoiéticas; LMA leucemia mieloide aguda; LLA leucemia linfóide aguda; Jan janeiro; Jun junho; Out outubro; Nov novembro; Jul julho; Mar março; ICS infecção de corrente sanguínea; IPPM infecção de pele e partes moles; S sim

Dez pacientes possuíam informação referentes a culturas de vigilância: 5 eram colonizados previamente e 1 havia apresentado infecção prévia por KRC.

Todos os pacientes foram tratados com terapia antimicrobiana combinada. Inicialmente todos receberam esquemas que incluíam um carbapenêmico e a maioria recebeu colistina empírica. Após o resultado dos testes de sensibilidade confirmar o perfil de resistência dos microorganismos, os esquemas foram modificados para incluir aminoglicosídeos (8 pacientes), tigeciclina (5 pacientes) e fosfomicina oral (1 paciente).

Nove dos onze pacientes morreram durante a internação, com seis mortes dentro de 14 dias do diagnóstico de infecção.

Dos 7 isolados disponíveis para análise, 6 foram positivos para *bla*_{kpc}. Foram identificados 6 PFT pela análise do perfil eletroforético por PFGE. O gene *mcr-1* foi detectado em 2 isolados. A primeira cepa positiva para *mcr-1* foi detectada em 2011 em amostra de infecção de corrente sanguínea e pertence ao ST347 e a outra amostra também foi isolada em infecção de corrente sanguínea, no ano de 2015 e pertence ao ST 16. Considerando alterações de membrana externa associadas a resistência a carbapenêmicos e colistina, foram identificadas mutações em porinas (OMP35, OMP36, OMP37) em todos os isolados. Quanto às mutações em genes para resistência a colistina, o sequenciamento completo do genoma demonstrou diferenças entre os isolados nos genes *pmrCAB*, *mgrB* e *phoQ*. A figura 10 representa o dendrograma dos isolados disponíveis e a análise dos mecanismos de resistência a colistina.

Figura 9 – Dendrograma e análise de genes de resistência a colistina de 7 isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e colistina de pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas no HCFMUSP. Legenda: PFT *Pulsed-field Type*; ST *Sequence Type*; CIM concentração inibitória mínima.

Esses dados foram descritos em artigo intitulado: “Colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* co-harboring KPC and MCR-1 in a Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit.” e publicados no periódico *Bone Marrow Transplantation* em 2019⁹³ (APÊNDICE C).

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

Este estudo descreve uma coorte retrospectiva de colonizações e infecções por KRC em pacientes submetidos a TCTH no HCFMUSP. No período de 2012 a 2015 verificou-se menor sobrevida no D+100 pós-TCTH tanto entre os pacientes com infecção, quanto por colonização por KRC quando comparados aos pacientes não-colonizados da coorte geral de TCTH do serviço.

Esses achados são similares aos de dois estudos^{40,41}, um em transplante autólogo realizado na Alemanha e outro em transplante alogênico conduzido na Polônia que avaliaram sobrevida em pacientes com colonização por bactérias MDR em TCTH. Esses estudos encontraram maior mortalidade não-relacionada a recidiva de doença em pacientes colonizados por MDR. Em ambos os estudos, entretanto, o número de pacientes colonizados por BGN resistente aos carbapenêmicos foi pequeno ou inexistente (nenhuma colonização no estudo com pacientes autólogos e duas colonizações no estudo polonês com pacientes submetidos a TCTH alogênico). Outros autores, em trabalhos conduzidos na Turquia e na Itália^{42,43}, avaliaram impacto da colonização por BGN MDR no TCTH com maior número de pacientes colonizados por enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (14 e 20, respectivamente) mas não demonstraram maior mortalidade nos pacientes colonizados.

A maior mortalidade dos pacientes com infecção por KRC não é surpreendente considerando o impacto de tal evento em uma população imunossuprimida como o pós-TCTH precoce. A menor sobrevida dos pacientes com colonização por KCR poderia representar um marcador de gravidade desses pacientes, muitos dos quais tem histórico de internações prévias e uso prévio de antimicrobianos de amplo espectro. A colonização por KRC poderia também representar um sinal de desbalanço do microbioma intestinal desses pacientes e poderia afetar de forma adversa o resultado do TCTH. A diversidade do microbioma intestinal tem sido implicada em papel imunomodulador no TCTH, afetando a reconstituição imunológica e o risco infeccioso e da DECH⁹⁴. Desse modo, poderiam ser adotadas estratégias de

descolonização do trato gastrointestinal de pacientes com KRC. Entre as possibilidades, o uso de probióticos tem sido estudado na unidade de TCTH-HCFMUSP e parece ser uma estratégia viável. Estudo preliminar⁹⁵ com uso oral de *Lactobacillus plantarum* em 7 pacientes submetidos a TCTH colonizados por *Enterococcus* resistente à vancomicina e BGN resistente a carbapenêmico observou que apenas um paciente permaneceu colonizado com BGN MDR após uso de probióticos orais embora tenha ocorrido dois episódios de ICS por BGN no período.

A despeito disso, as medidas de controle de infecção hospitalar continuam sendo de grande importância para reduzir a disseminação de KRC. A implementação de programa efetivo de vigilância ativa de colonização depende da acurácia dos métodos utilizados. Nos 105 pacientes identificados nesta coorte, 28,5% apresentaram infecção e dos pacientes com infecção, aproximadamente a metade (46,7%) era sabidamente colonizada por KRC. Esses resultados podem sugerir que as infecções que ocorreram nos pacientes não-colonizados não são decorrentes de fonte endógena do trato gastrointestinal. Essa hipótese não pôde ser avaliada em nosso estudo uma vez que havia poucas amostras pareadas de cada paciente e não foi possível demonstrar clonalidade de cepas de colonização e infecção do mesmo indivíduo.

Entretanto, parte desses achados também podem ser explicados pela menor sensibilidade (cerca de 78% para enterobactérias conforme Snyder, 2012⁹⁶) do método de cultura de vigilância para identificação dos pacientes com colonização. A utilização de métodos de detecção de DNA como PCR pode aumentar a sensibilidade do rastreamento mas é limitada por identificar apenas sequências previamente conhecidas⁹⁷ e por seu custo ainda elevado. Um estudo recente realizado no HCFMUSP utilizando um teste molecular automatizado de PCR *real time* que identifica carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{IMP-1} e *bla*_{VIM}) encontrou sensibilidade de 94% e especificidade de 98,6% do método⁹⁸.

Embora trabalhos sugiram que a colonização prévia por KRC é fator de risco para infecção posterior^{42,44,99}, não há evidência robusta na literatura indicando cobertura antimicrobiana empírica para KRC nos episódios de

neutropenia do pacientes sabidamente colonizados.

Em um estudo multicêntrico caso-controle¹⁰⁰ na Itália, os fatores de risco para ICS por KRC em pacientes previamente colonizados encontrados na análise multivariada foram admissão em UTI (OR 1,65 IC 1,05-2,59 p 0,03), procedimento abdominal invasivo (OR 1,87 IC 1,16-3,04 p 0,01), quimio/radioterapia (OR 3,07 IC 1,78-5,29 p<0,0001) e número de sítios adicionais de colonização (OR 3,37 por sítio IC 2,56-4,43 p<0,0001).

Em comparação, em nossa coorte de pacientes, os pacientes com infecção por KRC diferiram significativamente dos pacientes colonizados com maior frequência de internação em UTI e neutropenia no momento da positividade de cultura e são compatíveis com a maior gravidade esperada dos pacientes com infecção. Como se tratava de coorte de pacientes de TCTH, todos os pacientes haviam sido submetidos a quimioterapia durante o condicionamento para o transplante. Não foi avaliado de forma sistemática mais de um sítio de colonização para KRC e os pacientes não foram submetidos a procedimentos abdominais invasivos.

Entre os pacientes que desenvolveram infecção por KRC, nota-se alta mortalidade com 19 (63,3%) óbitos em 30 dias, semelhante à descrita na série de casos de infecção por KRC em TCTH de pacientes de centros italianos⁴⁴. Isso demonstra que a infecção por esse microorganismo tem impacto significativo na sobrevida dos pacientes submetidos a TCTH e reforça a importância da prevenção de colonização e do uso racional de antimicrobianos nessa população de pacientes.

Na análise bivariada de fatores associados a óbito em 14 dias, houve associação significativa com sexo masculino (RR=0,51 IC0,28-0,92 p=0,02) e internação em terapia intensiva (RR=2,57 IC1,44-4,59 p<0,001) e tendência de associação com medula óssea como fonte de células-tronco (RR=2,62 IC0,79-8,7 p=0,06). Pacientes críticos, particularmente imunossuprimidos como a população submetida a transplante, apresentam maior gravidade e seria esperado também maior risco de óbito pela infecção. A tendência de associação com a medula óssea como fonte de células-tronco poderia refletir o maior tempo médio até a enxertia com maior duração de neutropenia, o que tornaria esses pacientes mais vulneráveis ao processo infeccioso.

De forma inesperada, entretanto, na análise multivariada permaneceu significativa apenas o sexo masculino como fator protetor para óbito nos pacientes com infecção por KRC. A literatura médica é controversa quanto à influência do gênero no risco de óbito. Dois estudos que avaliaram mortalidade por sepse e choque séptico em pacientes cirúrgicos em UTI mostram resultados conflitantes, com maior risco de óbito no sexo feminino no trabalho de Eachempati *et al.*¹⁰¹ mas sem diferença no estudo por Wichmann¹⁰². A mesma controvérsia ocorre também quanto à influência do gênero no risco de óbito por infecção por *Staphylococcus aureus*¹⁰³. Na população de TCTH não foram encontrados estudos associando risco de óbito por infecção e gênero.

Outros fatores estudados em nossa coorte de pacientes que poderiam refletir maior gravidade como infecção por KRC resistente à colistina, adequação da terapia antimicrobiana, tempo de neutropenia e evolução com insuficiência renal aguda e necessidade de hemodiálise não foram associados a maior risco de óbito.

Contudo, é interessante notar que, dos 57 pacientes com infecção (30 infecções por KRC e 27 episódios de neutropenia febril), uma parcela significativa (30) evoluiu com insuficiência renal aguda, inclusive com necessidade de terapia renal substitutiva (8). É plausível que um componente dessa piora de função renal possa ser relacionado à toxicidade de esquema antimicrobiano, especialmente da classe de polimixinas³², uma vez que a maioria (48/57) recebeu terapia antimicrobiana de associação que incluiu meropenem e colistina. Não foi possível avaliar esta hipótese neste estudo uma vez que apenas 9 pacientes não receberam esse esquema antibiótico.

Na análise microbiológica dos isolados do banco de cepas a *bla*_{KPC} foi a carbapenemase mais frequentemente detectada mas houve discrepâncias entre os métodos de detecção (PCR/RT-PCR Cepheid e SGC). Esses achados podem sugerir que o uso de diferentes técnicas possam ser complementares para a detecção de *bla*_{KPC}, gene em geral encontrado em plasmídeos na *Klebsiella pneumoniae*. A predominância de KPC como carbapenemase mais prevalente nesta coorte é condizente com a epidemiologia do HCFMUSP, onde este mecanismo de resistência foi descrito em >80% das cepas resistentes a carbapenêmicos em 2017¹⁰⁴.

Foi detectada co-expressão de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} em 3 amostras de infecção de nossa coorte. Não foram encontradas outras descrições dessa associação na literatura médica até a presente data. Uma relato de nosso grupo com série de 5 casos de co-expressão de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} está sendo elaborada para publicação.

O estudo de clonalidade dos isolados do banco de cepas por PFGE demonstrou um padrão policlonal. Amostras do PFT K ocorreram nos anos de 2012 a 2014, mas a maioria (16/19) de isolados de colonização e de infecção ocorreu em 2012, quando foi instituída vigilância ativa de KRC na unidade. Nos anos subsequentes, a distribuição dos isolados manteve padrão policlonal, mas dessa vez não houve preponderância de algum PFT nas cepas de infecção e colonização. Esses achados podem ser reflexo de menor representatividade dos anos de 2013-15 entre as amostras disponíveis no banco de cepas do LIM/49. Entretanto, outra explicação possível seja que o programa de vigilância ativa de MDR possa ter contribuído para a diminuição e controle da disseminação clonal de cepas de KRC na unidade. Essa hipótese parece corroborada pela redução no número culturas positivas sem que houvesse diminuição do número de TCTHs realizados.

Nas cepas em que foi realizado SGC foi possível a avaliação por MLST. Dos 17 isolados sequenciados, 16 pertenciam a STs que fazem parte do Complexo Clonal CC258 (ST340/ST11/ST437), a linhagem clonal mais prevalente nos estudos de hospitais do Brasil^{63,65}.

A análise da resistência a antimicrobianos por SGC demonstrou presença de genes de resistência para múltiplas classes de antibióticos. Dentre eles destaca-se a presença em quase todas as amostras dos genes *oqx*A e *oqx*B, que codificam bomba de efluxo e são associados com baixos níveis de resistência a quinolonas¹⁰⁵. À época do estudo todos os pacientes submetidos a TCTH utilizavam levofloxacino como profilaxia antimicrobiana durante o período de neutropenia.

Outro achado interessante foi a constatação em todos os 17 isolados da presença do gene *fos*A, que codifica enzima glutatona-s-transferase associada com resistência a fosfomicina¹⁰⁶. Esse antibiótico tem sido sugerido como parte de terapêutica de resgate para tratamento de infecções por BGN pan-

resistente¹⁰⁷ mas a formulação parenteral não é atualmente disponível no Brasil. A presença de *fosA* no isolados de *Klebsiella pneumoniae* sugere que seu uso como monoterapia não parece opção viável em nosso meio¹⁰⁸. Em trabalho prospectivo realizado no HCFMUSP de uso de fosfomicina endovenosa no tratamento de 13 episódios de infecção por BGN resistentes a carbapenêmicos e a colistina, 8 pacientes obtiveram cura clínica e foi verificado sinergismo com meropenem¹⁰⁸.

Na análise de genes de virulência por SGC, os principais genes de virulência encontrados nas cepas sequenciadas na coorte são relacionados a adesão e formação de biofilme com *fimbriae* tipo 1 e tipo 3. As fímbrias tipo 1 são expressas tanto em cepas de *Klebsiella pneumoniae* ambientais como em isolados clínicos e são envolvidas na adesão bacteriana¹⁰⁹. As fímbrias tipo 3 são filamentos helicoidais são relacionadas à capacidade de formação de biofilme e podem ter papel no desenvolvimento de infecções relacionadas a cateteres por *Klebsiella pneumoniae*¹¹⁰.

Quanto à aquisição de ferro, foram mais frequentes os genes relacionados a síntese de enterobactina. Esse sideróforo é considerado ubíquo¹¹¹ na *Klebsiella pneumoniae*, presente tanto em cepas clássicas e hipervirulentas.

As cepas de *Klebsiella pneumoniae* não parecem apresentar diferenças de virulência mesmo quando são comparadas cepas de origem ambiental com amostras clínicas¹¹². Em estudo comparando isolados de colonização fecal e de cultura de abscesso hepático piogênico em Taiwan¹¹³ não houve diferença de virulência. De forma similar, não houve diferença importante na detecção de genes de virulência quando comparados as cepas de colonização e infecção por KRC em nosso estudo.

Um trabalho recente em hospital escola de São Paulo com 165 episódios de infecção por KRC identificou 20 casos de um clone hipervirulento pertencente ao ST16 com alta mortalidade⁶⁶. Apenas um isolado pertencia ao ST16 em nosso estudo e, a despeito de apresentar perfil de resistência a carbapenêmicos e a colistina com presença de *bla*_{KPC} e *mcr-1*, não apresentava perfil de hipervirulência. Esse isolado correspondia a amostra de infecção de corrente sanguínea de paciente de TCTH autólogo, que sobreviveu

ao episódio infeccioso.

Além do paciente citado, foi identificada nesta coorte uma série de outros 11 casos de infecções por KRC resistente à colistina com início em 2011. A alta mortalidade (81.8%) pode ser justificada porque a maior parte dos pacientes apresentava neutropenia grave à infecção e só recebeu esquema antimicrobiano com droga ativa para o microorganismo após resultados de sensibilidade (em geral >72 horas após identificação da bactéria em cultura). A demora na instituição de terapia adequada pode ter contribuído para a má evolução desses pacientes. Porém, a mortalidade relacionada à infecção, apesar de elevada, foi pouco mais elevada ou próxima a outras séries de infecção por KRC sensível a colistina na literatura^{44,114,115}.

O mecanismo de resistência a colistina *mcr-1* mediado por plasmídeo, cuja primeira descrição ocorreu na China em 2015³⁶, estava presente em isolado desta coorte de 2011. Este achado é condizente com a aparente disseminação global de *mcr-1* com relatos de microorganismos resistentes a colistina na Ásia, Europa e Américas¹¹⁶. No Brasil, *mcr-1* foi descrita em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* e pode ser fator de disseminação de resistência a colistina no país¹¹⁷.

Ainda há poucos relatos de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC e com plasmídeo contendo *mcr-1*. Dois relatos do Brasil encontraram isolados pertencentes ao ST437 e ST392^{117,118}. Em nosso estudo foram encontrados 2 isolados com gene *mcr-1*: um pertencente ao ST437 em que foi também detectado *bla_{KPC}* e outro em que não se detectou carbapenemase KPC pertencente ao ST16. A maioria dos isolados resistentes a colistina disponíveis para análise em nosso estudo não apresentava gene *mcr-1* detectado. No SGC foram encontradas mutações cromossômicas nos genes *pmrC*, *mgrB* e *lpxM* que podem levar a resistência a polimixinas.

O desenvolvimento de novos antimicrobianos com atividade contra microorganismos produtores de KPC parece promissor. Estudo recente¹¹⁹ do uso compassivo de ceftazidima-avibactam no tratamento de resgate de infecções por Enterobacterales resistentes a carbapenêmicos e a colistina com 29 pacientes, incluindo do HCFMUSP, demonstrou sucesso clínico em 82,7% dos casos com mortalidade em 14 dias de 33% nos casos de ICS, sugerindo

que este antibiótico possa ser opção terapêutica no tratamento de infecções por KRC resistente à colistina. Desde 2019 esse antimicrobiano foi padronizado para uso no HCFMUSP de acordo com critérios definidos pelo Grupo de Controle de Infecção Hospitalar, especialmente para tratamento de infecção de corrente sanguínea por KRC resistente à colistina.

Entretanto, considerando o potencial de disseminação de resistência a colistina por *mcr-1* mediada por plasmídeo e de mecanismos de resistência a carbapenêmicos por metalobetalactamases que não são inibidas pelo avibactam, ainda há preocupação com a possibilidade de infecções por KRC sem opções terapêuticas. Em nossa coorte de pacientes com KRC havia 3 isolados em que foi detectada *bla*_{NDM}, sugerindo a necessidade a inclusão do rastreamento de mecanismos de resistência a carbapenêmicos das KRC nas culturas de material clínico.

O presente estudo apresenta limitações principalmente em sua natureza observacional retrospectiva. Não foi possível, por exemplo, comparar o impacto do uso empírico de colistina nos episódios de neutropenia febril dos pacientes com colonização por KRC uma vez que apenas 4 pacientes não fizeram uso empírico deste antibiótico. Outra limitação foi a disponibilidade limitada de isolados bacterianos armazenados no banco de cepas: havia poucas amostras pareadas de mesmo paciente para colonização e infecção e não foi possível investigar se a cepa colonizante é posteriormente implicada no episódio de infecção por KRC.

Com a padronização e disponibilidade de testes rápidos moleculares para identificação de carbapenemases será possível aprimorar a sensibilidade e velocidade de detecção de KRC, otimizando as medidas de precaução e isolamento. A inclusão de ceftazidima-avibactam no arsenal de antimicrobianos para tratamento de KRC e a expectativa de novos antimicrobianos com atividade contra BGN resistentes a carbapenêmicos provavelmente trará modificações nesse cenário, com opções de menor toxicidade e possível impacto em mortalidade.

Após o período avaliado neste estudo, a unidade de internação do serviço de TCTH passou por uma reforma completa no ano de 2017. A partir de 2019 foi descontinuada rotina de uso de levofloxacino como antibioticoprofilaxia

durante a neutropenia com redução no número de infecções de corrente sanguínea por KRC (dados não publicados). O impacto desta mudança de profilaxia antimicrobiana dos pacientes do serviço de TCTH do HCFMUSP será avaliado em estudo posterior.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

- a) Pacientes submetidos a TCTH no HCFMUSP entre 2012 a 2015 com colonização e infecção por *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos apresentaram menor sobrevida em comparação aos pacientes não-colonizados por esse microorganismo.
- b) Nesta coorte de pacientes com culturas positivas por KRC, cerca de 30% apresentaram infecção por essa bactéria. Pacientes com infecção por KRC apresentaram alta mortalidade em 30 dias, com 36.7% dos óbitos considerados relacionados ao episódio infeccioso. Sexo feminino e admissão em UTI foram fatores associados a óbito em 14 dias em análise bivariada e houve tendência de associação com medula óssea como fonte de células-tronco. Na análise multivariada, o sexo masculino foi fator protetor para óbito relacionado à infecção.
- c) Predominou na coorte a carbapenemase *bla*_{KPC}, embora tenham sido detectados alguns isolados produtores de *bla*_{NDM}. Foram identificados genes de resistência a múltiplas classes de antimicrobianos além dos carbapenêmicos, incluindo quinolonas, aminoglicosídeos e fosfomicina. Mutações de porinas *ompk36* e *ompk37* foram frequentes e todos os isolados apresentavam *replicons* associados a plasmídeos.
Não houve diferenças na detecção de genes de virulência entre isolados de colonização e infecção. Os genes relacionados a sideróforo enterobactina e *fimbriae* tipo 1 e 3 foram os mais frequentes.
- d) A análise de clonalidade por PFGE mostrou distribuição policlonal, tanto entre os isolados de colonização como de

infecção. Predominou, por MLST, STs pertencentes ao CC258, mais prevalente no Brasil.

- e) Os casos de infecção por *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e à colistina ocorreram predominantemente em corrente sanguínea e apresentaram elevada mortalidade na coorte de pacientes submetidos a TCTH. Embora tenha sido detectado nos isolados, o gene *mcr-1* não foi o mecanismo de resistência a colistina predominante entre os isolados.

7. Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006;354(17):1813–26.
2. Bazinet A, Popradi G. A general practitioner's guide to hematopoietic stem-cell transplantation. *Curr Oncol*. 2019/06/01. 2019 Jun;26(3):187–91.
3. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos A. Registro Brasileiro de Transplantes ano XXV n.4. 2019;
4. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos A. Registro Brasileiro de Transplantes ano XX n. 4. São Paulo; 2014.
5. Wingard JR, Hsu J, Hiemenz JW. Hematopoietic stem cell transplantation: an overview of infection risks and epidemiology. *Infect Dis Clin North Am*. 2010 Jun;24(2):257–72.
6. Gratwohl A, Brand R, Frasson F, Rocha V, Niederwieser D, Reusser P, et al. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36(9):757–69.
7. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2009;15(10):1143–238.
8. Cappellano P, Viscoli C, Bruzzi P, Van Lint MT, Pereira CAP, Bacigalupo A. Epidemiology and risk factors for bloodstream infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *New Microbiol*. 2007;30(2):89–99.
9. Blennow O, Ljungman P, Sparrelid E, Mattsson J, Remberger M. Incidence, risk factors, and outcome of bloodstream infections during the pre-engraftment phase in 521 allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Transpl Infect Dis*. 2014 Feb 22;16(1):106–14.
10. Schuster MG, Cleveland AA, Dubberke ER, Kauffman CA, Avery RK, Husain S, et al. Infections in Hematopoietic Cell Transplant Recipients: Results From the Organ Transplant Infection Project, a Multicenter, Prospective, Cohort Study. *Open forum Infect Dis*. 2017;4(2):ofx050.
11. Mikulska M, Del Bono V, Raiola AM, Bruno B, Gualandi F, Occhini D, et al. Blood Stream Infections in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Reemergence of Gram-Negative Rods and Increasing Antibiotic Resistance. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Feb 22;15(1):47–53.
12. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-

- resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;18(3):268–81.
13. Macesic N, Morrissey CO, Cheng AC, Spencer A, Peleg AY. Changing microbial epidemiology in hematopoietic stem cell transplant recipients: increasing resistance over a 9-year period. *Transpl Infect Dis*. 2014 Feb 22;16(6):887–96.
 14. Mendes ET, Dulley F, Basso M, Batista MV, Coracin F, Guimarães T, et al. Healthcare-associated infection in hematopoietic stem cell transplantation patients: risk factors and impact on outcome. *Int J Infect Dis*. 2012 Feb 22;16(6):e424–8.
 15. Massaro KSR, Macedo R, de Castro BS, Dulley F, Oliveira MS, Yasuda M a. S, et al. Risk factor for death in hematopoietic stem cell transplantation: are biomarkers useful to foresee the prognosis in this population of patients? *Infection*. 2014;42(6):1023–32.
 16. Organização Mundial de Saúde O. Ten Threats to Global Health in 2019 [Internet]. 2019 [cited 2020 Nov 1]. Available from: <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>
 17. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Med*. 2006;119(6 Suppl 1):S20-28; discussion S62-70.
 18. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and Prevention. *Clin Infect Dis*. 2011 Feb 22;53(1):60–7.
 19. Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis*. 2017 Feb 15;215(suppl_1):S28–36.
 20. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289(1036):321–31.
 21. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Feb 22;20(3):440–58.
 22. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009/09/21. 2009 Dec;53(12):5046–54.
 23. Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011/02/22. 2011 May;55(5):2420–3.
 24. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW,

- Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(4):1151–61.
25. Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early Dissemination of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Feb 24;53(7):3180.
 26. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(1):333–4.
 27. Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: overview of a major public health challenge. *Médecine Mal Infect*. 2014;44(2):51–6.
 28. Sanitária (Brasil) Agência Nacional de Vigilância. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015. 2016.
 29. Epidemiológica (São Paulo) Centro de Vigilância. Sistema de Vigilância das Infecções Hospitalares do Estado de São Paulo Dados 2018. 2019.
 30. Freire MP, Abdala E, Moura ML, de Paula FJ, Spadão F, Caiaffa-Filho HH, et al. Risk factors and outcome of infections with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in kidney transplant recipients. *Infection*. 2015;
 31. Freire MP, Pierrotti LC, Filho HHC, Ibrahim KY, Magri ASGK, Bonazzi PR, et al. Infection with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* in cancer patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2015;34(2):277–86.
 32. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Jul;21(3):449–65.
 33. Sanitária (Brasil) Agência Nacional de Vigilância. RESOLUÇÃO-RE Nº 1.634, DE 21 DE JUNHO DE 2018. Diário Of da União. 2018;Edição 120(Seção 1: Suplemento 25/6/2018):34.
 34. Karaiskos I, Lagou S, Pontikis K, Rapti V, Poulakou G. The “Old” and the “New” Antibiotics for MDR Gram-Negative Pathogens: For Whom, When, and How . Vol. 7, *Frontiers in Public Health* . 2019. p. 151.
 35. Kwa AL, Tam VH, Falagas ME. Polymyxins: A Review of the Current Status Including Recent Developments. *Ann Acad Med Singapore*. 2008;37:870–83.
 36. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16:161–8.

37. Aires CAM, da Conceição-Neto OC, Tavares E Oliveira TR, Dias CF, Montezzi LF, Picão RC, et al. Emergence of the Plasmid-Mediated mcr-1 Gene in Clinical KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(7).
38. Bartolleti F, Seco BMS, Capuzzo Dos Santos C, Felipe CB, Lemo MEB, Alves T da S, et al. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(10):1849–51.
39. Boszczowski I, Salomão MC, Moura ML, Freire MP, Guimarães T, Cury AP, et al. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: genetic diversity, mechanisms of resistance to polymyxins and clinical outcomes in a tertiary teaching hospital in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019 Jun;61:e29.
40. Bilinski J, Robak K, Peric Z, Marchel H, Karakulska-Prystupik E, Halaburda K, et al. Impact of Gut Colonization by Antibiotic-Resistant Bacteria on the Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Retrospective, Single-Center Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(6):1087–93.
41. Scheich S, Reinheimer C, Brandt C, Wichelhaus TA, Hogardt M, Kempf VAJ, et al. Clinical Impact of Colonization with Multidrug-Resistant Organisms on Outcome after Autologous Stem Cell Transplantation: A Retrospective Single-Center Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017 Sep 1;23(9):1455–62.
42. Forcina A, Lorentino F, Marasco V, Oltolini C, Marcatti M, Greco R, et al. Clinical Impact of Pretransplant Multidrug-Resistant Gram-Negative Colonization in Autologous and Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018 Jul 1;24(7):1476–82.
43. Demiraslan H, Cevahir F, Berk E, Metan G, Cetin M, Alp E. Is surveillance for colonization of carbapenem-resistant gram-negative bacteria important in adult bone marrow transplantation units? *Am J Infect Control*. 2017 Jul 1;45(7):735–9.
44. Girmenia C, Rossolini GM, Piciocchi A, Bertaina A, Pisapia G, Pastore D, et al. Infections by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in SCT recipients: a nationwide retrospective survey from Italy. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Feb;50(2):282–8.
45. Ferreira AM, Moreira F, Guimarães T, Spadão F, Ramos JF, Batista MV, et al. Epidemiology, risk factors and outcomes of multi-drug resistant bloodstream infections in hematopoietic stem cell transplant recipients: importance of previous gut colonisation. *J Hosp Infect*. 2018;
46. Sanitária (Brasil) Agência Nacional de Vigilância. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. 2017;

47. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, De Angelis G, Falcone M, Frank U, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jan 1;20:1–55.
48. US C for DC and P. Facility Guidance for Control of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) November 2015 Update. 2015.
49. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med*. 2005 Jun;165(12):1430–5.
50. Kochar S, Sheard T, Sharma R, Hui A, Tolentino E, Allen G, et al. Success of an infection control program to reduce the spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009 May;30(5):447–52.
51. Donskey CJ, Deshpande A. Effect of chlorhexidine bathing in preventing infections and reducing skin burden and environmental contamination: A review of the literature. *Am J Infect Control*. 2016 May;44(5 Suppl):e17–21.
52. Huang SS, Septimus E, Kleinman K, Moody J, Hickok J, Avery TR, et al. Targeted versus universal decolonization to prevent ICU infection. *N Engl J Med*. 2013 Jun;368(24):2255–65.
53. Munoz-Price LS, Hayden MK, Lolans K, Won S, Calvert K, Lin M, et al. Successful control of an outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* at a long-term acute care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010 Apr;31(4):341–7.
54. Babiker A, Lutgring JD, Frikdin S, Hayden MK. Assessing the Potential for Unintended Microbial Consequences of Routine Chlorhexidine Bathing for Prevention of Healthcare Associated Infections. *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2020 Aug;
55. Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM. Mechanisms of Increased Resistance to Chlorhexidine and Cross-Resistance to Colistin following Exposure of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates to Chlorhexidine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Jan;61(1).
56. Mendes ET, Ranzani OT, Marchi AP, Silva MT da, Filho JUA, Alves T, et al. Chlorhexidine bathing for the prevention of colonization and infection with multidrug-resistant microorganisms in a hematopoietic stem cell transplantation unit over a 9-year period: Impact on chlorhexidine susceptibility. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(46).
57. Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev*. 1993 Oct 1;6(4):428 LP – 442.

58. Peterson LR, Hamilton JD, Baron EJ, Tompkins LS, Miller JM, Wilfert CM, et al. Role of clinical microbiology laboratories in the management and control of infectious diseases and the delivery of health care. *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2001 Feb;32(4):605–11.
59. Sanitária (Brasil) Agência Nacional de Vigilância. Nota Técnica 01/2013 MEDIDAS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES POR ENTEROBACTÉRIAS MULTIRESISTENTES. 2013.
60. Quainoo S, Coolen JPM, van Hijum SAFT, Huynen MA, Melchers WJG, van Schaik W, et al. Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clin Microbiol Rev*. 2017 Oct 1;30(4):1015 LP – 1063.
61. Larsen M V, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1355–61.
62. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, et al. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jul;55(7):3579–83.
63. Pereira PS, de Araujo CFM, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef APD, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother*. 2013 Feb;68(2):312–6.
64. Castanheira M, Costello AJ, Deshpande LM, Jones RN. Expansion of clonal complex 258 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin American hospitals: report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Vol. 56, *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012. p. 1661–8.
65. Aires CAM, Pereira PS, Rocha-de-Souza CM, Silveira MC, Carvalho-Assef APD, Asensi MD. Population Structure of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Surveillance Rectal Swabs in Brazil. *Microb Drug Resist*. 2020 Jun;26(6):652–60.
66. Andrey DO, Pereira Dantas P, Martins WBS, Marques De Carvalho F, Almeida LGP, Sands K, et al. An Emerging Clone, *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2–Producing *K. pneumoniae* Sequence Type 16, Associated With High Mortality Rates in a CC258-Endemic Setting. *Clin Infect Dis*. 2020 Oct 23;71(7):e141–50.
67. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research Electronic Data Capture (REDCap) - A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform*. 2009;42(2):377–81.
68. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of

- classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis.* 1987;40(5):373–83.
69. Creutzig U, Kaspers GJL. Revised recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2004;22(16):3432–3.
 70. Rowlings PA, Przepiorka D, Klein JP, Gale RP, Passweg JR, Henslee-Downey PJ, et al. IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br J Haematol.* 1997;97(4):855–64.
 71. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2005;11(12):945–56.
 72. Prevention CFDC and. CDC/NHSN Surveillance Definitions for Specific Types of Infections. In: National Healthcare Safety Network (NHSN) Patient Safety Component Manual. 2018.
 73. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control.* 1988;16(3):128–40.
 74. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control.* 2008;36(5):309–32.
 75. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003;31(4):1250–6.
 76. Le Gall J-R, Lemeshow S, Saulnier F. A New Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) Based on a European/North American Multicenter Study. *J Am Med Assoc.* 1993;270:2957–63.
 77. Klastersky J, Paesmans M, Rubenstein EB, Boyer M, Elting L, Feld R, et al. The Multinational Association for Supportive Care in Cancer risk index: A multinational scoring system for identifying low-risk febrile neutropenic cancer patients. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2000;18(16):3038–51.
 78. Lee C-C, Lee C-H, Hong M-Y, Tang H-J, Ko W-C. Timing of appropriate empirical antimicrobial administration and outcome of adults with community-onset bacteremia. *Crit Care.* 2017;21(1):119.
 79. Kollef MH. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clin Infect Dis An Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2000;31 Suppl 4:S131-138.

80. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement - M100-S22. Wayne,PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2012.
81. Testing TEC on AS. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0, 2018. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. 2018.
82. Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. Clin Infect Dis An Off Publ Infect Dis Soc Am. 2004;39(1):55–60.
83. Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. J Antimicrob Chemother. 2011;66(6):1255–9.
84. Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother. 2012;67(4):906–9.
85. Pfaller MA, Hollis RJ, Sader HS. Chromosomal restriction fragment analysis by pulsed-field gel electrophoresis. In: Clinical microbiology procedures handbook. 1993.
86. de Maio Carrillho CMD, Gaudereto JJ, Martins RCR, de Castro Lima VAC, de Oliveira LM, Urbano MR, et al. Colistin-resistant *Enterobacteriaceae* infections: clinical and molecular characterization and analysis of in vitro synergy. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017;87(3):253–7.
87. Assefa S, Keane TM, Otto TD, Newbold C, Berriman M. ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. Bioinformatics. 2009;25(15):1968–9.
88. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 2014;30(14):2068–9.
89. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. J Antimicrob Chemother. 2012;67(11):2640–4.
90. Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. Nucleic Acids Res. 2019 Jan;47(D1):D687–92.
91. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics. 2009;25(14):1754–60.
92. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics. 2009;25(16):2078–9.

93. Higashino HR, Marchi AP, Martins RCR, Batista MV, Perdigão Neto LV, Lima VACC, et al. Colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* co-harboring KPC and MCR-1 in a Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit. Bone Marrow Transplant. 2019;54(7).
94. Manzo VE, Bhatt AS. The human microbiome in hematopoiesis and hematologic disorders. Blood. 2015 Jul 16;126(3):311–8.
95. Moraes BGC, Martins RCR, Franco LAM, Lima VACC, Pereira GCO, Santos JT, et al. 2665. Intestinal Microbiome of Patients Submitted to Hematopoietic Stem Cell Transplantation Using *Lactobacillus plantarum* to Decolonized Multidrug-Resistant Bacteria. Open Forum Infect Dis. 2019 Oct 23;6(Supplement_2):S933–4.
96. Snyder GM, D'Agata EMC. Diagnostic accuracy of surveillance cultures to detect gastrointestinal colonization with multidrug-resistant gram-negative bacteria. Am J Infect Control. 2012 Jun;40(5):474–6.
97. Viau R, Frank KM, Jacobs MR, Wilson B, Kaye K, Donskey CJ, et al. Intestinal Carriage of Carbapenemase-Producing Organisms: Current Status of Surveillance Methods. Clin Microbiol Rev. 2016 Jan 1;29(1):1 LP – 27.
98. Cury AP, Almeida Junior JN, Costa SF, Salomão MC, Boszczowski Í, Duarte AJS, et al. Diagnostic performance of the Xpert Carba-R™ assay directly from rectal swabs for active surveillance of carbapenemase-producing organisms in the largest Brazilian University Hospital. J Microbiol Methods. 2020 Apr;171:105884.
99. Cattaneo C, Di Blasi R, Skert C, Candoni A, Martino B, Di Renzo N, et al. Bloodstream infections in haematological cancer patients colonized by multidrug-resistant bacteria. Ann Hematol. 2018 Sep;97(9):1717–26.
100. Giannella M, Trecarichi EM, De Rosa FG, Del Bono V, Bassetti M, Lewis RE, et al. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection among rectal carriers: a prospective observational multicentre study. Clin Microbiol Infect. 2014 Dec 1;20(12):1357–62.
101. Eachempati SR, Hydo L, Barie PS. Gender-Based Differences in Outcome in Patients With Sepsis. Arch Surg. 1999 Dec 1;134(12):1342–7.
102. Wichmann MW, Inthorn D, Andress H-J, Schildberg FW. Incidence and mortality of severe sepsis in surgical intensive care patients: the influence of patient gender on disease process and outcome. Intensive Care Med. 2000;26(2):167–72.
103. Tacconelli E, Foschi F. Does gender affect the outcome of community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteraemia? Clin Microbiol Infect. 2017 Jan 1;23(1):23–5.
104. Rossi F, Girardello R, Cury AP, Di Gioia TSR, Almeida Jr JN de, Duarte

- AJ da S. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years . Vol. 21, Brazilian Journal of Infectious Diseases . scielo ; 2017. p. 98–101.
105. Li J, Zhang H, Ning J, Sajid A, Cheng G, Yuan Z, et al. The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1):44.
 106. Elliott ZS, Barry KE, Cox HL, Stoesser N, Carroll J, Vegesana K, et al. The Role of *fosA* in Challenges with Fosfomycin Susceptibility Testing of Multispecies *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing. Ledebauer NA, editor. *J Clin Microbiol*. 2019 Oct 1;57(10):e00634-19.
 107. Pontikis K, Karaiskos I, Bastani S, Dimopoulos G, Kalogirou M, Katsiari M, et al. Outcomes of critically ill intensive care unit patients treated with fosfomycin for infections due to pandrug-resistant and extensively drug-resistant carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43(1):52–9.
 108. Perdigão Neto LV, Oliveira MS, Martins RCR, Marchi AP, Gaudereto JJ, da Costa LATJ, et al. Fosfomycin in severe infections due to genetically distinct pan-drug-resistant Gram-negative microorganisms: synergy with meropenem. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Jan 1;74(1):177–81.
 109. Stahlhut SG, Tchesnokova V, Struve C, Weissman SJ, Chattopadhyay S, Yakovenko O, et al. Comparative Structure-Function Analysis of Mannose-Specific FimH Adhesins from Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli; *J Bacteriol*. 2009 Nov 1;191(21):6592 LP – 6601.
 110. Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol*. 2010;10(1):179.
 111. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016 Sep 1;80(3):629 LP – 661.
 112. Struve C, Krogfelt KA. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Environ Microbiol*. 2004 Jun;6(6):584–90.
 113. Siu LK, Fung C-P, Chang F-Y, Lee N, Yeh K-M, Koh TH, et al. Molecular Typing and Virulence Analysis of Serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Liver Abscess Patients and Stool Samples from Noninfectious Subjects in Hong Kong, Singapore, and Taiwan. *J Clin Microbiol*. 2011 Nov 1;49(11):3761 LP – 3765.
 114. Tumbarello M, Trecarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Giacobbe DR, Bassetti M, et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Jul 1;70(7):2133–43.
 115. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Trecarichi EM, Tumietto F, Marchese A,

- et al. Predictors of Mortality in Bloodstream Infections Caused by *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase–Producing *K. pneumoniae*: Importance of Combination Therapy. *Clin Infect Dis*. 2012 Oct 1;55(7):943–50.
116. Wang R, van Dorp L, Shaw LP, Bradley P, Wang Q, Wang X, et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nat Commun*. 2018;9(1):1179.
 117. Conceição-Neto OC, Aires CAM, Pereira NF, da Silva LHJ, Picão RC, Siqueira BN, et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;50(2):282–4.
 118. Dalmolin TV, Martins AF, Zavascki AP, de Lima-Morales D, Barth AL. Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018;90(2):132–3.
 119. Guimarães T, Nouér SA, Martins RCR, Perdigão Neto L V, Martins WMBS, Narciso Barbosa AC, et al. Ceftazidime-Avibactam as Salvage Therapy for Infections Caused by *Enterobacteriales* Coresistant to Carbapenems and Polymyxins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Oct 1;63(10):e00528-19.

Apêndices

APÊNDICE A – FICHAS DE COLETA DE DADOS REDCAP

Confidencial APC em TMO com reportagem

Pág. 2

Ficha

Racord ID: _____

Dados Demográficos

RCHC: _____

Nome: _____

Data de nascimento: _____

Idade: _____

Sexo: ☐ Feminino ☐ Masculino

Dados Clínicos relacionados ao transplante

Doença de base: _____

estágio da doença de base: ☐ ativa ☐ remissão completa ☐ remissão parcial ☐ recidiva ☐ remissão

Data de internação: _____

Motivo de internação: _____

Tipo de transplante: ☐ autólogo ☐ alogênico aparençado ☐ alogênico não aparençado ☐ haploidentico ☐ não transplanteado

Autólogo x Alogênico: _____

fontes células tronco: ☐ perifericas ☐ medula ossea

Condicionamento: _____

21/09/2012 12:11 proj@redcap.org

Confidencial Pág. 2

DATA DO TMO: _____

Presença de mucosite: _____

Mucosite (OMS), p. ex grau: ☐ 0 Sem Mucosite ☐ 1 Eritema ☐ 2 Úlceras, aimentação sólida ☐ 3 Úlceras, aimentação líquida ☐ 4 Não consegue se alimentar via oral

Presença de NPT/NPP: _____

Nutrição Parenteral: ☐ Não ☐ NPP ☐ NPT

Cateter Central: ☐ Dúpla -unien curta permanência ☐ Singley ☐ Pericatheter (totalmente inserido) ☐ Longa permanência - inserido

Se RCS relacionada, racou CVC? ☐ Yes ☐ No

Data de retirada: _____

data de evento: _____

Intensidade prevista: ☐ Yes ☐ No

data informação prev a 1: _____

data a ta previa 1: _____

data informação prev a 2: _____

data a ta previa 2: _____

data informação prev a 3: _____

data a ta previa 3: _____

data informação prev a 4: _____

21/09/2012 12:11 proj@redcap.org

Confidencial Pág. 3

data a ta previa 4: _____

data informação prev a 5: _____

data a ta previa 5: _____

data informação prev a 6: _____

data a ta previa 6: _____

data informação prev a 7: _____

data a ta previa 7: _____

data informação prev a 8: _____

data a ta previa 8: _____

profilaxia gvhd: ☐ Yes ☐ No

regime de profilaxia gvhd: _____

GVHD: ☐ Yes ☐ No

Tipo GVHD: ☐ agudo ☐ crônico

tipo e grau de gvhd

	I	II	III	IV	não local
Pele	☐	☐	☐	☐	☐
Tubo Gastrointestinal	☐	☐	☐	☐	☐
Hepático	☐	☐	☐	☐	☐
Outro órgão	☐	☐	☐	☐	☐

tratamento gvhd: _____

Neutropenia febril ANTES do TMO: ☐ Yes ☐ No

21/09/2012 12:11 proj@redcap.org

Confidencial Pág. 4

Tratamento previo de infecção
Uso previo de anti-fúngico: _____

Uso previo de antibiotico nos ultimos 90 dias ANTES DA primeira CULTURA

	Sim	Não
quinolona	☐	☐
cefalosporina de 3a geração	☐	☐
g-purino	☐	☐
cefalosporina antipseudomonas	☐	☐
carbapenem	☐	☐
polimixina	☐	☐
aminoglicosídeos	☐	☐

	Sim	Não
AIDS	☐	☐
IRC	☐	☐
ICC	☐	☐
IAM (doença coronariana)	☐	☐
Doença vascular periferica	☐	☐
DPOC	☐	☐
AVC	☐	☐
Demençia	☐	☐
Hemiplegia	☐	☐
Doença tecido conjuntivo	☐	☐
Úlcera péptica	☐	☐
MDS	☐	☐

Diabetes: ☐ Não tem ☐ Sem complicações ☐ Lesão órgão alvo

Doença hepática: ☐ Não tem ☐ Leve ☐ Moderada ou grave

Doença Maligna: ☐ Não tem ☐ Leucemia: infiltração na luz do local radio ☐ Tu tumorado radioterapia

Outra comorbidade: _____

Idade Charlson: _____

Em Charlson: _____

21/09/2012 12:11 proj@redcap.org

Confidencial

APC em UTI com sepse/infecção

21/09/2020 12:16

Projeto: REDCap

Colonização ou Infecção CRK

Record ID

Nome

RGHC

Presença de CRK

Colonização prévia

Data de colonização

Data de cultura infecção

Neutrófilos na data de cultura

Colônia R

Sítio de infecção

Outro sítio (QUAL)

Co-infecção

Agentes isolados

Confidencial

21/09/2020 12:16

Projeto: REDCap

MASCC - só se neutropenico

Sintomas clínicos

Índice sintomas

H pneumônia (PVS < 90)

Índice hipotensão

DPOC

Índice DPOC

Tipos de câncer

Índice câncer

Desidratação (incoercíveis fluidos cv)

Índice desidratação

Status na febre

Índice status febre

Idade MASCC

Índice dado mascc

MASCC

UTI

Foi para UTI?

Confidencial

21/09/2020 12:16

Projeto: REDCap

SAPS II - pior valor nas 12h

Índice SAPS II

Frequência cardíaca (pior)

Índice FC SAPS

P ou PA sistólica

Índice PA SAPS

Febre maior que 38C

Índice Temperatura SAPS

GCS

Índice GCS SAPS

PMQ/FIO2 se em VV ou CPAP

Índice PMQ/FIO2 SAPS

Ureia (BUN x 2,14)

Índice Jireia SAPS

Debitos urinário

Índice Jireia SAPS

Confidencial

21/09/2020 12:16

Projeto: REDCap

Sódio

Índice Sódio SAPS

Potássio

Índice Potássio SAPS

Bicarbonato

Índice Bicarbonato SAPS

Bilirrubina

Índice Bilirrubina SAPS

Leucócitos

Índice Leucócitos SAPS

Doença crônica

Índice Doença Crônica SAPS

Admissão

Índice Admissão SAPS

SAPS II

Confidential

PAGE 5

SOFA

Pso2/F O2 SOFA ☐ > 400
☐ < 400
☐ < 300
☐ < 200 e IOT
☐ < 100 e IOT

Índice Respiratório SOFA _____

GCS SOFA ☐ 15
☐ 13-14
☐ 10-12
☐ 6-9
☐ < 6

Índice Neuro SOFA _____

Cardiovascular SOFA ☐ PAM > 70
☐ PAM < 70
☐ dose < 5 na dose
☐ dose > 5 ou nota < 0.1
☐ dose > 15 ou nota > 0.1

Índice Cardio SOFA _____

Bilirrubina SOFA ☐ < 1.2
☐ 1.2-1.9
☐ 2.0-5.9
☐ 6.0-11.9
☐ > 12

Índice Fígado SOFA _____

Plaquetas SOFA ☐ > 150
☐ < 150
☐ < 100
☐ < 50
☐ < 20

Índice Coagulação SOFA _____

Creatinina SOFA ☐ < 1.2
☐ 1.2-1.9
☐ 2.0-3.4
☐ 3.5-4.9
☐ > 5.0

Índice Rins SOFA _____

SOFA _____

21/09/2012 12:16 PROJECT/INICIO-012 REDCap

Confidential

PAGE 6

Antibioticoterapia

Terapia antibiótica ☐ Monoterapia
☐ Terapia combinada

Monopositi ☐ Yes
☐ No

data início mem _____

data fim micro _____

Amoxicilina ☐ Yes
☐ No

data do início amox _____

data do fim amox _____

Gentamicina ☐ Yes
☐ No

data do início gent _____

data fim gent _____

Polimixina ☐ Yes
☐ No

data início pol _____

data fim pol _____

Tigeciclina ☐ Yes
☐ No

data início tge _____

data fim tge _____

Penicilina ☐ Yes
☐ No

data início pen _____

21/09/2012 12:16 PROJECT/INICIO-012 REDCap

Confidential

PAGE 7

data fim foto _____

Outros aids _____

Adequação do tratamento ☐ Adequada (um pico antes < 48h)
☐ Inadequada (até nos 48h ou após 48h)

Resposta ao tratamento ☐ Resposta Clínica (resolução das síndromes)
☐ Cultura Microbiológica
☐ Persistência de infecção (mesmo agente > 5d)

Desfecho Infecção ☐ Obten < 14 dias de infecção
☐ Obten em 30 dias de infecção
☐ Sobrevida > 30 dias

Obten em 14 dias? _____

tempo até infecção _____

21/09/2012 12:16 PROJECT/INICIO-012 REDCap

APÊNDICE B – Aprovação CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: FATORES ASSOCIADOS À KLEBSIELLA SP. RESISTENTE A CARBAPENÊMICOS EM UNIDADE DE TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS
Pesquisador Responsável: Sílvia Figueiredo Costa
Pesquisador Executor: HERMES RYDITI HIGASHINO
Co-autores: Maria Cristina de Macedo; Thais Guimarães; Flavia Rossi
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Orientador: Sílvia Figueiredo Costa
Instituição: HCFMUSP
Departamento: MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

Versão:

CAAE: 50237715.4.0000.0068

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 13854

Número do Parecer: 1.310.231

Data da Relatoria: 04/11/2015

Apresentação do Projeto: Trata-se de coorte retrospectiva, com avaliação do prontuário de pacientes internados na Unidade de Transplante de Medula Óssea do HCFMUSP no período de 01 de janeiro de 2013 a 31 de dezembro de 2014. Será avaliada a incidência e fatores associados à colonização ou infecção por *Klebsiella* sp. Resistente a carbapenêmicos em pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas. Isolados bacterianos de amostras obtidas desses pacientes, no mesmo período, será utilizado para análises laboratoriais (estudo molecular para caracterização da resistência ao antibiótico) e comparação com dados clínicos.

Objetivo da Pesquisa: Avaliar a incidência e fatores relacionados à colonização ou infecção por *Klebsiella* sp. resistente a carbapenêmicos em pacientes da Unidade de Transplante de Medula Óssea do HCFMUSP. (Período: 01 de janeiro de 2013 a 31 de dezembro de 2014); caracterizar as carbapenemases dos isolados bacterianos e a clonalidade; descrever episódios de infecção resistente a carbapenêmicos no período e sua evolução e avaliar a colonização prévia por *Klebsiella* sp. resistente a carbapenêmicos como fator de risco para desenvolvimento de infecção por este micro-organismo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há riscos ou benefícios

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Eventos infecciosos por bacilos gram-negativos constituem importante causa de mortalidade em pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas. O estudo avaliará a incidência de infecção por BGN, em especial *Klebsiella* sp., a carbapenêmicos na Unidade de Transplante de Medula Óssea do HCFMUSP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Dispensa TCLE (estudo retrospectivo)

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Sem pendências.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
SS 11 2661-7585 - SS 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 05 de Novembro de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Monsur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Predio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq-admin@hc.fm.usp.br

Colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* co-harboring KPC and MCR-1 in a Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit

Hermes Ryoiti Higashino¹ · Ana Paula Marchi² · Roberta Cristina Ruedas Martins² · Marjorie Vieira Batista¹ · Lauro Vieira Perdigão Neto² · Victor Augusto Camarinha de Castro Lima² · Flavia Rossi³ · Thais Guimarães⁴ · Anna Sara Levin^{1,2} · Vanderson Rocha⁵ · Sílvia Figueiredo Costa^{1,2}

Received: 21 August 2018 / Revised: 23 October 2018 / Accepted: 19 November 2018 / Published online: 30 November 2018
© Springer Nature Limited 2018

Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRK) infections have increased all over the world, becoming an important pathogen in immunocompromised patients that is associated with high morbidity and mortality [1]. Colistin is commonly used as a last resort treatment of CRK infections but the description of a plasmid-mediated resistance gene *mcr-1* in 2015 raised concerns about antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae* [2].

Hematopoietic stem cell transplant (HSCT) patients, especially during the neutropenic phase before engraftment, are vulnerable to infections from healthcare-associated bacteria but there are few reports of colistin-resistant CRK infections in this population.

Here we describe a case series of concomitant colistin- and CRK infections in a retrospective cohort of HSCT recipients from a 2000-bed university hospital in São Paulo, Brazil. Ethical approval for this study was obtained from the

hospital research ethics committee under number 1.310.231. We retrospectively evaluated all patients admitted to the Bone Marrow Transplantation Unit from 2008–2015 to identify colistin- and CRK infections. Demographic and clinical data were retrieved from the patients' charts and electronic records. Data about previous colonization with CRK, when available, was provided by the Hospital Infection Control Subcommittee. Since 2012, patients in the HSCT unit were surveilled for colonization with CRK with weekly rectal swab or stool cultures and placed under contact precautions. Outcomes were defined as cure, overall mortality, and infection-related death (within 14 days of infection).

Carbapenem resistance was defined as resistance to ertapenem, imipenem, or meropenem and colistin resistance was defined by EUCAST as MIC >4 mg/L. Analysis of resistance mechanisms was done through PCR for *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} and *mcr-1* and by whole genome sequencing using MiSeq IlluminaTM (Illumina, San Diego, USA). Genome de novo assembly was carried out with VelvetOptimiser v2.2.5 (Victorian Bioinformatics Consortium, Australia). The contigs were ordered by Abacas v.1.3.1 [3] using the reference genome from the strain *Klebsiella pneumoniae* MGH78578, which is available on the website of the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Annotation was performed with Prokka v.1.11 [4]. Multilocus Sequence Typing was analyzed by MLSTfinder tool [5] and confirmed in the database PubMLST Pasteur (<http://pubmlst.org>). The study of resistance genes was performed using the Resfinder tool (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) [6]. The complete genome sequences were deposited at the DDBJ/EMBL/GenBank under accession numbers: isolate 1 (QOHZ000000000), isolate 2 (QOID000000000), isolate 3 (QOIH000000000), isolate 4 (NBIT000000000), isolate 5 (QOHX000000000), isolate 6 (QOIA000000000), isolate 7 (QOUG000000000). Analysis of clonality was performed

✉ Hermes Ryoiti Higashino
hermes.higashino@hc.fm.usp.br

¹ Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

² Laboratório de Investigação Médica em Protozoologia, Bacteriologia e Resistência Antimicrobiana - LIM/49, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

³ Departamento de Patologia, Divisão de Microbiologia do Laboratório Central - LIM/03, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴ Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

⁵ Departamento de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Fig. 1 Patient characteristics and microbiology profiles and whole genome sequencing results from clinical isolates. N/A, not available; AML, acute myeloid leukemia; ALL, acute lymphoid leukemia; BSI, bloodstream infection; UTI, urinary tract infection; SSTI, skin and soft

tissue infection; PFT, pulsed-field type; ST, sequence type; MIC, minimal inhibitory concentration; CAZ-AVIBACTAM, ceftazidime-avibactam

through pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) as follows: Chromosomal DNA of all *K. pneumoniae* isolates were treated using enzyme FastDigest BcuI (Life Sciences, Canada). PFGE was performed using a CHEF DR-III system (Bio-Rad, USA). Clonal profiles were analyzed using BioNumerics bioinformatics software v.7.6 (Applied Maths). Tolerance and optimization of 1.5% were used for comparison using the method of Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA), and Dice similarity coefficient was generated with <90% considered different.

From the total of 1042 HSCT in the period, twelve infections due to colistin-resistant CRK infections were diagnosed (ten bloodstream infections BSI, one urinary tract infection UTI and one secondary bacteremia from skin and

soft tissue infection SSTI) in eleven patients. Patient data is described on Fig. 1a. Nine of the patients were severely neutropenic (<100 neutrophils/mm³) at the time of the diagnosis of infection (median days from admission to infection: 19, -2-70 days). Half of these patients (5) also had concurrent infection with another pathogen: *Pseudomonas aeruginosa* (2) *Aspergillus* sp. (1), Cytomegalovirus (1), *Serratia marcescens* (1). Surveillance culture data was available for ten patients: five had been previously colonized with colistin-resistant CRK and one had been previously infected with colistin-susceptible CRK. Three patients were treated with colistin during the six months preceding the infection with colistin-resistant CRK.

All patients received combination antibiotic therapy. Initially all patients but one were treated with regimens that

included carbapenem and colistin. After susceptibility tests results were confirmed, treatment regimens were modified to include aminoglycosides (11), tigecycline (6), and oral fosfomycin (1). Nine patients died during hospital stay with six deaths occurring within 14 days of infection.

Antibiotic susceptibility testing for available isolates was performed by broth microdilution for meropenem, imipenem and colistin; agar dilution for fosfomycin; disk diffusion for ceftazidime-avibactam; and VITEK-2 system for amikacin and tigecycline. All isolates tested were positive for *bla*_{KPC}, except one (isolate 5), no *bla*_{NDM} isolates were found among these patients. Seven isolates were available for clonality analysis with PFGE, which demonstrated isolates to be polyclonal. In two isolates, *mcr-1* gene was detected. The first strain harboring *mcr-1* was from 2011 (named as isolate 3 belonging to ST347) and the other one was found in a strain from 2015 (named as 4 belonging to ST16). Regarding carbapenem and colistin-resistance mechanisms, mutations on porins (OMP35, OMP36, OMP37) were observed in all isolates. In addition, mutations on *pmrCAB*, *mgrB*, *phoQ* that lead to colistin-resistance differed among isolates (Fig. 1b).

In this case series from our cohort of HSCT patients, we identified infections with colistin- and carbapenem-resistant *K. pneumoniae* since 2011. The high overall mortality of these patients (81.8%) could be explained in part because they were severely immunosuppressed at the time of the infection (most of them were neutropenic). All patients were started on an antibiotic regimen that included an active drug for colistin-resistant CRK only after colistin susceptibility results were available (usually >72 h after the identification of the microorganism), which may have had an effect in the mortality rate of these patients. It is of note, however, that our infection-related death rate seems to be similar to previous reports of colistin-susceptible CRK infection [7].

We found that MCR-1, a plasmid-mediated colistin-resistance mechanism first described in China in 2015 [2], was present in our isolates since 2011. This is consonant with the seemingly worldwide dissemination of *mcr-1* with colistin-resistant isolates being reported in Asia, Europe and America [8]. In Brazil, *mcr-1* has been described in *E. coli* and *K. pneumoniae* and is thought to have a role in the dissemination of colistin resistance in the country [9].

There are still few reports of KPC-producing *K. pneumoniae* harboring *mcr-1* plasmid. Two recent reports from Brazil found KPC-producing *K. pneumoniae* carrying plasmid-mediated *mcr-1* gene in isolates belonging to ST437 and 392 [9, 10]. In our study we found 2 isolates harboring MCR-1, one belonging to ST437 and co-harboring KPC and another assigned as ST16. These isolates also presented chromosomal mutations on

genes *pmrC*, *mgrB* and *lpxM* that can lead to colistin-resistance.

Recent antibiotic developments with the availability of beta-lactam and beta-lactamase inhibitor combinations (e.g., ceftazidime-avibactam, meropenem-vaborbactam) may have an important role in the treatment of these severe infections [7]. Moreover, considering the potential for worldwide dissemination of this plasmid-mediated *mcr-1* resistance mechanism, there's concern for almost impossible-to-treat infections with concomitant colistin-resistant and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, particularly in the HSCT patient population. Therefore, transplant clinicians should remain vigilant to the finding of such pan-resistant isolates and consider screening for this resistance mechanism.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Oliveira AL, De Souza M, Carvalho-Dias VMH, Ruiz MA, Silla L, Tanaka PY, et al. Epidemiology of bacteremia and factors associated with multi-drug-resistant gram-negative bacteremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2007;39:775–81.
- Liu Yi-Yun, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16:161–68.
- Assefa S, Keane TM, Otto TD, Newbold C, Berriman M. ABA-CAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. *Bioinforma Oxf Engl*. 2009;25:1968–9.
- Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinforma Oxf Engl*. 2014;30:2068–9.
- Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol*. 2012;50:1355–61.
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:2640–4.
- Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, et al. Carbapenemase-producing organisms: A Global Scourge. *Clin Infect Dis*. 2018;66:1290–7.
- Wang R, van Dorp L, Shaw LP, Bradley P, Wang Q, Wang X, et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nat Commun*. 2018;9:1179.
- Conceição-Neto OC, Aires CAM, Pereira NF, da Silva LHJ, Picão RC, Siqueira BN, et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;50:282–4.
- Dalmolin TV, Martins AF, Zavascki AP, de Lima-Morales D, Barth AL. Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018;90:132–3.