

ANÁLISE FILOGENÉTICA DE CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CAUSADORAS DE INFECÇÕES RELACIONADAS A ASSISTÊNCIA EM SAÚDE (IRAS)

ISADORA BOHLMANN DUARTE¹; DANIELA RODRIGUERO WOZEAK²;
ISABEL LADEIRA PEREIRA³; THAYNÁ LANER CARDOSO⁴; DAIANE DRAWANZ
HARTWIG⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – isadorabduarte05@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – danielarwozeak@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – isabelladeirapereira@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – nanalaner@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria Gram-negativa, imóvel e anaeróbia facultativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. É caracterizada também por sua ubiquidade, o que a torna prevalente em diversos ambientes e vários tipos de superfícies (ROCHA et al., 2022). Esse atributo faz com que a *K. pneumoniae* seja uma das principais causadoras de infecções oportunistas adquiridas no ambiente hospitalar, provocando casos clínicos especialmente mais graves em neonatos, idosos e pacientes imunocomprometidos. Dentre os quadros desencadeados, destacam-se doenças associadas ao sistema respiratório, urinário e gastrointestinal (ROCHA et al., 2022). Ademais, outros fatores que contribuem fortemente para a permanência dessa espécie nesse tipo de local são a sua capacidade de formação de biofilmes e resistência a antibióticos.

Diante desse cenário, a vigilância epidemiológica e genética de *K. pneumoniae* em ambientes hospitalares torna-se fundamental, visto que representa um grave risco à saúde pública devido ao seu perfil de resistência a antibióticos (MOHD ASRI et al., 2021). Nesse contexto, destaca-se a produção de enzimas pelas cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (KPC), as quais são capazes de hidrolisar carbapenêmicos - fármacos de última linha, utilizados no tratamento de infecções graves (TSIOITIS et al., 2021). A disseminação de genes codificadores dessas enzimas, frequentemente localizados em plasmídeos conjugativos, favorece a transferência horizontal de resistência entre diferentes cepas e espécies bacterianas, potencializando a propagação de clones multirresistentes e limitando drasticamente as opções terapêuticas disponíveis (ELAHI et al., 2019).

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo determinar e analisar o padrão filogenético de cepas de *K. pneumoniae* causadoras de infecções relacionadas a assistência em saúde (IRAS), visando compreender os fatores que favorecem a persistência e disseminação desse microrganismo em contextos hospitalares, considerando dispositivos médicos, materiais de uso clínico e interação humana.

2. METODOLOGIA

Essa pesquisa utilizou 34 isolados clínicos de *K. pneumoniae*, coletados entre 2015 e 2017, provenientes do Laboratório de Microbiologia do Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas (HE - UFPel) e cedidos para o

Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios (LaBBio - UFPel). Para avaliação da diversidade genética e da presença de clones entre diferentes isolados clínicos de *K. pneumoniae*, foi realizada a técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), a qual é comumente utilizada para a genotipagem de microrganismos (NEO et al., 2019) e que, nesse estudo, determinou a similaridade genética entre as amostras. Essa técnica permite a separação de fragmentos grandes de DNA por meio de um campo elétrico alternado, com diferentes ângulos e a leitura é feita em gel de agarose de acordo com a posição das bandas. Dessa maneira, a partir da representação do genoma bacteriano de cada isolado, foi possível fazer comparações para averiguar padrões de semelhança.

Os 34 isolados foram submetidos a amplificação do gene *dnaA* por meio da técnica de PCR para confirmação da espécie *K. pneumoniae*. Logo, para a realização da técnica de PFGE, as amostras foram cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) a 37°C por 18 horas e a concentração da suspensão de células bacterianas foi mensurada em espectrofotômetro até atingir uma densidade óptica igual a 3. Posteriormente, realizou-se a extração de DNA e digestão com a enzima de restrição *XbaI*. Como marcador de peso molecular, foi utilizado o DNA da cepa *Salmonella* sorotipo Braenderup H9812, o qual também foi digerido com a enzima *XbaI*. As condições de eletroforese foram as seguintes: corrida por 18 horas a 6V/cm, temperatura de 14°C e tempos de troca eletroforética de 6 a 36 segundos. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 20 min, lavados com água destilada por 40 min e foto documentados no Sistema L-PIX Touch (Loccus).

Os padrões de macro restrição foram analisados utilizando o software Bionumerics (versão 7.1, Applied Maths, Bélgica). Para a análise do padrão de similaridade entre as cepas, calculou-se o Coeficiente de Similaridade de Dice com tolerância de 1%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as amostras analisadas, 28 revelaram a presença do gene *dnaA*, confirmando a espécie *K. pneumoniae* pela técnica de PCR convencional. Já os resultados obtidos pela técnica de PFGE revelaram a presença de 18 clones dentre os 28 isolados clínicos, que receberam denominação A - R (Figura 1). Os isolados são considerados clones quando apresentam $\geq 80\%$ de similaridade genética. Dentre os clones, o principal grupamento foi o H, em 28,56% (8) dos isolados, estando presente em múltiplos pacientes entre os anos de 2015 a 2017, coletados de diversas origens (hemocultura, urocultura e escarro). Em seguida, destaca-se o grupo K, clone detectado em 10,71% (3) dos isolados, todos coletados em 2017 em 3 pacientes e todos de aspirado traqueal. E o terceiro clone mais frequente é o grupo O, com um padrão comum em 2 isolados (7,14%) de dois pacientes, em coleta de escarro.

A semelhança acentuada entre a filogenia das amostras corrobora a hipótese de que a disseminação clonal é uma das principais responsáveis pelo aumento de cepas multirresistentes (MDR), extensivamente resistentes (XDR) e pan-resistentes (PDR) (WOZEAK et al., 2024). Tal problemática dificulta e, por vezes, impossibilita o tratamento para infecções desencadeadas por *K. pneumoniae*, especialmente quando acomete neonatos, idosos ou imunocomprometidos.

Somado a isso, o aumento de cepas produtoras de carbapenases por *K. pneumoniae*, responsável pela resistência aos carbapenêmicos e a outros

beta-lactâmicos é favorecida pela aquisição do gene que codifica esta enzima por parte de bactérias que, originalmente, não o possuem. Isso ocorre por meio de mecanismos como transferência de elementos genéticos móveis entre espécies bacterianas (DAVID et al., 2019), a qual é favorecida pela permanência de cepas KPC no ambiente hospitalar.

A Organização Mundial da Saúde categorizou as enterobactérias produtoras de carbapenemases como parte do grupo crítico na lista de patógenos bacterianos prioritários divulgada em 2024. Essa categoria contempla bactérias que possuem escassas opções de tratamento, como a *K. pneumoniae*, fazendo com que medidas para controle da disseminação se tornem imprescindíveis (WHO, 2024).

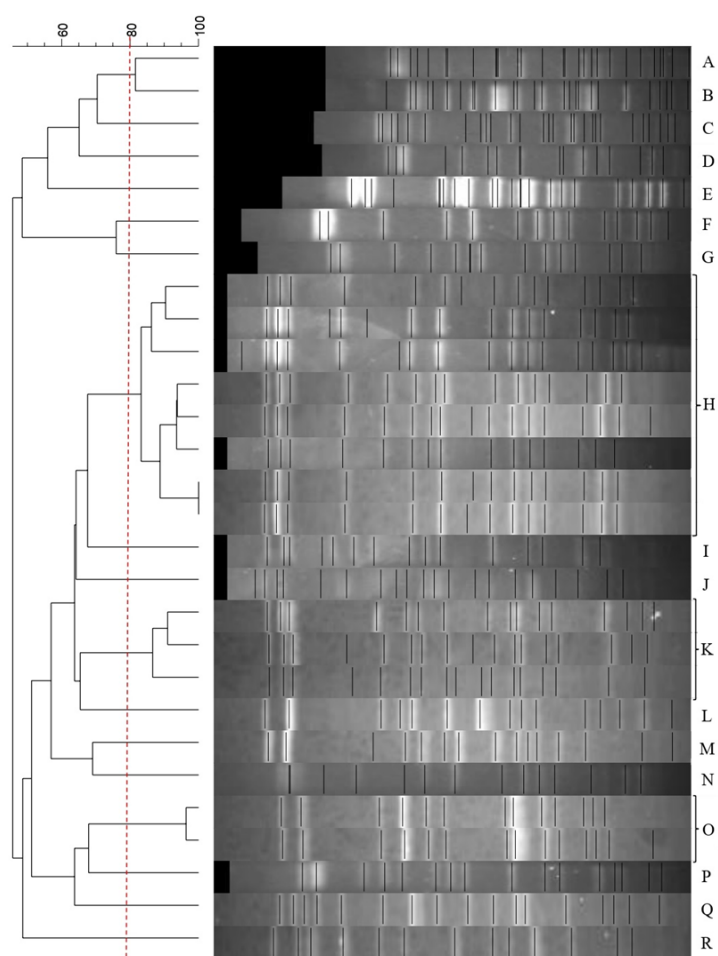


Figura 1 - Dendrograma de 28 isolados de *K. pneumoniae* provenientes do Hospital Escola (HE-UFPEL), Pelotas, RS, Brasil. Isolados considerados clones apresentaram similaridade $\geq 80\%$.

4. CONCLUSÕES

Os achados deste estudo evidenciam a urgência na implementação de medidas mais eficazes para conter a disseminação de *K. pneumoniae* em ambientes hospitalares. A adoção de protocolos rigorosos de controle é fundamental para reduzir a incidência de IRAS não apenas por esse patógeno, mas também por outros micro-organismos oportunistas. Ademais, a caracterização genética dessas bactérias constitui uma ferramenta estratégica

para identificar determinantes moleculares de resistência e virulência, bem como, para orientar o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos ou terapias alternativas capazes de superar perfis de resistência cada vez mais complexos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DAVID, S.; REUTER, S.; HARRIS, S. R.; GLASNER, C.; FELTWELL, T.; ARGIMON, S.; ABUDAHAB, K.; GOATER, R.; GIANI, T.; ERRICO, G.; ASPBURY, M.; SJUNNEBO, S.; EUSCAPE WORKING GROUP; ESGEM STUDY GROUP; FEIL, E. J.; ROSSOLINI, G. M.; AANENSEN, D. M.; GRUNDMANN, H. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. **Nature Microbiology**, v. 4, p. 1919-1929, 2019.

ELAHI, A.; AKYA, A.; LORESTANI, R. C.; GHADIRI, K.; BAAKSHII, S. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical centers in Kermanshah using pulse field gel electrophoresis. **Iranian Journal of Public Health**, [S.l.], v. 48, n. 9, p. 1694-1702, 2019.

MOHD ASRI, N. A.; AHMAD, S.; MOHD ZAIDI, N. F.; MOHAMUD, R.; IREKEOLA, A. A.; MOHD HANAFI, N.; SHUEB, R. H.; YEE, L. C.; MOHD NOOR, N.; MUSTAFA, F. H.; CHAN, Y. Y.; YUSOF, N. Y. Global Prevalence of Nosocomial Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Antibiotics**, Basel, v. 10, 1508, 2021.

NEO, H.-M.; TAN, X.-E.; SAPRI, H. F.; TAN, T. L. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 74, 2019.

ROCHA, J.; HENRIQUES, I.; GOMILA, M.; MANAIA, C. M. Common and distinctive genomic features of *Klebsiella pneumoniae* thriving in the natural environment or in clinical settings. **Scientific Reports**, v. 12, 10441, 2022.

TSIOUTIS, C.; EICHEL, V. M.; MUTTERS, N. T. Transmission of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae*: the role of infection control. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l.], v. 76, n. 1, p. 4-11, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance**. Acessado em 10 ago. 2025. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf?sequence=1>

WOZEAK, D. R.; PEREIRA, I. L.; CARDOSO, T. L.; NETO, A. C. P. S.; HARTWIG, D. D. Genetic diversity, drug resistance and biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* associated with nosocomial infection in Pelotas, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 56, p. 373-382, 2025.