

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
RENORBIO**

**AMANDA CRISTINA DA COSTA GUIMARÃES**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES *TNF $\alpha$* , *IL1 $\beta$* ,  
*IL6* E *IL10* DE PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADE  
HOSPITALAR COM INFECÇÃO BACTERIANA NO  
SANGUE**

Recife, PE

2019

**AMANDA CRISTINA DA COSTA GUIMARÃES**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES *TNF $\alpha$* , *IL1 $\beta$* ,  
*IL6* E *IL10* DE PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADE  
HOSPITALAR COM INFECÇÃO BACTERIANA NO  
SANGUE**

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* – Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Pernambuco - Nucleadora UFRPE, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz

Recife, PE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

G963a Guimaraes, Amanda Cristina da Costa.  
Análise de polimorfismos dos genes TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 E IL10 de  
pacientes internados em unidade hospitalar com infecção bacteriana  
no sangue / Amanda Cristina da Costa Guimaraes. – Recife, 2019.  
134 f.: il.

Orientadora: Maria Tereza Cartaxo Muniz.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia – RENORBIO, Recife, BR-PE, 2019. Ponto focal em  
Pernambuco – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Inclui referências e apêndice(s).

1. Infecção hospitalar 2. Virulência (Microbiologia)  
3. Imunologia 4. Klebsiella pneumoniae I. Muniz, Maria Tereza  
Cartaxo, orient. II. Título

CDD 620.8

# **TERMO DE APROVAÇÃO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
RENORBIO**

**TESE DE DOUTORADO ELABORADA POR:**

**AMANDA CRISTINA DA COSTA GUIMARÃES**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES *TNF $\alpha$* , *IL1 $\beta$* , *IL6* E *IL10* DE  
PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADE HOSPITALAR COM INFECÇÃO  
BACTERIANA NO SANGUE**

## **BANCA EXAMINADORA**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 13 de agosto de 2019

### **Orientador:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARIA TEREZA CARTAXO MUNIZ  
Departamento de Biologia – UPE

### **Examinadores:**

---

Prof. Dr. FÁBIO SÉRGIO BARBOSA DA SILVA  
Departamento de Biologia – UPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARCIA MARIA CAMARGO DE MORAIS  
Departamento de Biologia – UPE

---

Prof. Dr. PAULO ROBERTO ELEUTÉRIO DE SOUZA  
Departamento de Biologia – UFRPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. TERESINHA GONÇALVES DA SILVA  
Departamento de Farmácia – UFRPE

*“Por isso concluí que não há nada melhor para o homem do que desfrutar do seu trabalho,  
porque esta é a sua recompensa.”*

Ec. 3:22a

## **AGRADECIMENTOS**

Início esse texto agradecendo a minha luz, o ar que eu respiro, ao meu Deus, pois sem a sua presença em minha vida, nada disso seria possível e agradeço a minha linda família que constitui meu alicerce, que desperta todos os melhores sentimentos em mim e que nunca me permitir duvidar da minha capacidade, em especial ao meu esposo Filipe e a minha filha Sofia. Agradeço a UPE e a UFRPE/RENORBIO por toda a infraestrutura, aulas e apoio que recebi, em especial a secretária (Sandra Morgado), por sempre me socorrerem nos apuros documentais. A minha orientadora, Maria Tereza Cartaxo Muniz, por toda instrução, apoio, incentivo e compreensão que recebi, que será sempre meu exemplo a ser seguido. Agradeço a minha eterna orientadora e mãe científica, Marcia Maria Camargo de Moraes, que sempre me ajudou fazendo tudo ao seu alcance para me apoiar desde a minha iniciação científica até esse momento de defesa de TESE de doutorado. Ainda agradeço a minha segunda mãe científica, Marinalda Ancelmo Vivala, por todos os cafés com bactérias que tomamos juntas e principalmente pelos conselhos na hora dos maiores sufocos que passei. Levarei os conselhos das duas para toda a minha vida, devo muito a vocês, a profissional que me tornei. Também quero agradecer as minhas amigas Carol Almeida e Bea Godoi a quem sempre recorri quando as coisas se complicavam e que sempre me ajudaram me orientando nas melhores decisões com meu projeto. E agradeço muito especialmente aos meus amigos do laboratório, que vou levar para toda vida Barbara, Luiza, Juliana e Giw, que tonaram os dias de experimentos bem mais agradáveis, obrigada por me fazerem rir muito. E por fim, gostaria de agradecer ao CNPq, a CAPES e a FACEPE pelo apoio financeiro, pois sem ele, esse trabalho não seria possível.

## RESUMO

A *Klebsiella pneumoniae* é um dos patógenos identificados mais frequentemente causando infecção hospitalar em pacientes hospitalizados, uma vez que possui resistência intrínseca e diversos fatores de virulência. Infecções causadas por essas bactérias podem resultar em septicemia e choque séptico, que é desencadeado por lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede bacteriana, estimulando neutrófilos, macrófagos, células endoteliais e músculos a uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias como TNF $\alpha$ , IL1, IL6 e IL8. No entanto, a modulação dessa resposta exacerbada pode ser alcançada pela IL10. O objetivo deste trabalho foi identificar os polimorfismos em genes de imunidade relacionados à susceptibilidade de pacientes desenvolverem infecções bacterianas e quais fatores de virulência estão presentes nesses patógenos. Foram analisados 100 pacientes para os polimorfismos TNF $\alpha$  -308 G/A, IL1 $\beta$ -511 C/T, IL6 -174 G/C e IL10 -1082G/A, todos pelo método de PCR. As 41 cepas de *K. pneumoniae* de culturas de sangue foram investigadas quanto à presença de genes de virulência por PCR específico, e as determinações das Sequências Tipo foram realizadas por MLST. A produção de cápsula foi quantificada pela determinação da concentração de ácido urônico. A análise estatística foi realizada pelo teste *G de Williams*, OddsRatio (OR) com 95%, *Trend test* (Cochran-Armitage) e *Teste de Tukey*. Variáveis quantitativas e qualitativas foram analisadas pelo teste *t-student*. Nossos resultados revelam que homocigotos para o alelo A em IL10 -1082G/A têm um risco quatro vezes maior de desenvolver infecção bacteriana em comparação com pacientes heterocigotos para esse polimorfismo. Além disso, enfatizamos que 99,6% das *K. pneumoniae* são hipervirulentas, pois apresentam pelo menos cinco genes de virulência. Em conclusão, nossos achados revelaram que o polimorfismo IL10 -1082G/A e características clínicas podem ser usados como marcadores para o desenvolvimento de infecção bacteriana.

Palavras-Chave: Infecção hospitalar; Virulência bacteriana; Imunologia dos pacientes; susceptibilidade.

## ABSTRACT

*Klebsiella pneumoniae* is one of the most commonly identified pathogens causing nosocomial infection in hospitalized patients, as it has intrinsic resistance and several virulence factors. Infections caused by these bacteria can result in septicemia and septic shock, which is triggered by lipopolysaccharides (LPS) present in the bacterial wall, stimulating neutrophils, macrophages, endothelial cells and muscles to an exacerbated production of proinflammatory cytokines such as TNF $\alpha$ , IL1, IL6 and IL8. However, modulation of this exacerbated response can be achieved by IL10. The objective of this work was to identify the polymorphisms in immunity genes related to the susceptibility of patients to develop bacterial infections and which virulence factors are present in these pathogens. We analyzed 100 patients for *TNF $\alpha$ -308 G / A*, *IL1 $\beta$ -511 C / T*, *IL6 -174 G / C* and *IL10 -1082G/A* polymorphisms, all by PCR. The 41 strains of *K. pneumoniae* from blood cultures were investigated for the presence of virulence genes by specific PCR, and determinations of Type Sequences were performed by MLST. Capsule production was quantified by determination of uronic acid concentration. Statistical analysis was performed by *Williams G test*, *95% OddsRatio (OR)*, *Trend test (Cochran-Armitage)* and *Tukey test*. Quantitative and qualitative variables were analyzed by the *t-student test*. Our results reveal that homozygotes for allele A in *IL10 -1082G/A* have a fourfold higher risk of developing bacterial infection compared with heterozygous patients for this polymorphism. In addition, we emphasize that 99.6% of *K. pneumoniae* are hypervirulent because they have at least five virulence genes. In conclusion, our findings revealed that *IL10 -1082G/A* polymorphism and clinical features can be used as markers for the development of bacterial infection.

Keywords: Hospital infection; Bacterial virulence; Immunology of patients; susceptibility.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Imunidade inata e adaptativa após exposição ao patógeno	14
Figura 02: Subpopulação de células T CD4+ e principais citocinas produzidas	18
Figura 03: Citocinas ativadas após a exposição ao LPS bacterianos	22
Figura 04: <i>Klebsiella pneumoniae</i> em microscopia eletrônica	29
Figura 05: Fatores de virulência em cepas classicas e hipervirulentas	31
Figura 06: Estrutura bacteriana	32
Figura 07: Fímbrias visualizadas por microscopia eletrônica de varredura em isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	35
Figura 08: Sítio de ação das enzimas beta-lactamases.	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Concentração inibitória mínima de antibiótico para Enterobacterias	51
Tabela 02 - Concentração inibitória mínima de antibiótico para Gram positivos	52
Tabela 03 - Genes de expressão constitutiva de <i>K. pneumoniae</i>	53
Tabela 04 - Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos genes humanos	53
Tabela 05 - Oligonucleotídeos iniciadores para investigação dos genes de virulência	60
Tabela 06 - Oligonucleotídeos iniciadores para investigação dos genes de resistência	61
Tabela 07: Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo genético em pacientes com infecção bacteriana e controles.	63
TABELA 08. Genes de resistência e sequência tipo dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	65

## LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

*A. baumannii* – *Acinetobacter baumannii*

AMO/AC. CLA – Amoxicilina/ácido Clavulânico

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – Coleção Americana de Culturas Tipo - (American Type Culture Collection)

AZT – Aztreonam

BHI - Infusão Cérebro Coração – (Brain Heart Infusion)

*bla* -Beta-lactamase

CAZ – Ceftazidima

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CFL - Cefalotina

CFP - Cefepime

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CIP - Ciprofloxacina

CLSI – Instituto de Padronização de Laboratórios Clínicos (Clinical Laboratory Standards Institute)

CTX – Cefotaxima

CTXN - Ceftriaxona

DHP -1- Dehidropeptidase-1

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Dinucleotideo Trifosfato - (Deoxynucleoside Triphosphate)

*E. coli* – *Escherichia coli*

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

EMB – Eosina Azul de Metileno – (Eosin Methylene Blue)

ESBL – Beta-lactamase de Espectro Estendido – (Extended Spectrum Beta Lactamase)

EUCAST – Comissão Europeia sobre Teste de Susceptibilidade a Antibiótico - (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing)

FDA – Administração de Alimentos e Drogas - (Food and Drug Administration)

GEN – Gentamicina

GES – Guiana Extended-spectrum Serine Beta-lactamase

GIM – German Imipenemase

IL – Interleucina

INC – Incompatibilidade

IPM - Imipenem

IPM – Imipenemase

IRAS - Infecção Relacionada à Assistência à Saúde

IS - Sequências de Inserção

*K. pneumoniae*- *Klebsiella pneumoniae*

kb – kilobases

KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LB - Luria- Bertani

LPS - Lipopolissacarídeos

M – Molar

MBL - Lectinas ligadora à manose

MBL – Metallo-betalactamases

MDR – Multidroga Resistente

MER - Meropenem

MFP – Proteína de Fusão de Membrana - (Membrane Fusion Protein)

mg - Miligrama

mL - Mililitro

MLST – MultiLocus Sequence Typing

mM - Milimolar

MRSA - *Staphylococcus aureus* Resistentes à Oxacilina

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NDM - Nova Deli Metallo-betalactamase

NK - *Natural Killer*

NLRs - Nod like receptors

NO – OxidoNítrico

nm – Nanômetro

OMP - Proteína da Membrana Externa – (OuterMembraneProtein)

Orf - Quadro de Leitura Aberta – (Open Reading Frame)

OXA – Oxacilinase

*P. aeruginosa – Pseudomonas aeruginosa*

PAMPS - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis

PGRP - proteína de reconhecimento de peptidoglicanos

pH - Potencial Hidrogeniônico

PMN – Polimorfonucleares

pmol – Picomol

POL B – Polimixina B

PPT – Piperacilina/tazobactam

rpm – Rotação por Minuto

RRP - Receptores de Reconhecimento de Padrões

*S. marcescens – Serratiamarcescens*

SC - Sistema Complemento

SHV – Beta-lactamase tipo Sulfidril variável

SIM - Seul Imipenemase

SNPs - Polimorfismos de nucleotídeo único

SPM - São Paulo Metallo-betalactamase

SRIS - Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

ST – Sequence Type

Taq – *Thermophilus aquaticus*

TBE - Tris, EDTA, Ácido bórico

TE - Tris, EDTA

TEM – Beta-lactamase tipo Temoniera

TGC – Tigeciclina

TLRs - Toll like receptors

TNF $\alpha$ - fatordenecrosetumoral $\alpha$

Tris – Hidroximetilaminometano

UFC – Unidade formadora de colônias

USA - *United StatesofAmerica*

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

VIM – Verona Imipenemase

VNTR –Número Variável de Repetições *in tandem*

$\mu$ g – Micrograma

$\mu$ L – Microlitro

$\mu$ M – Micromolar

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 PECULIARIDADE DAS INFECÇÕES HOSPITALARES.....	14
2.1.1 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO.....	14
2.1.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NAS INFECÇÕES.....	16
2.1.3 SUSCEPTIBILIDADE ÀS INFECÇÕES.....	19
2.2 VARIANTES GENÉTICA ASSOCIADA COM SUSCEPTIBILIDADE A INFECÇÃO.....	21
2.3 AGENTES INFECCIOSOS.....	27
2.3.1 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	30
2.3.2 MECANISMO DE RESISTÊNCIA.....	38
2.3.2.1 RESISTÊNCIA AOS BETA-LACTÂMICOS.....	40
2.3.2.2 RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS.....	42
3. JUSTIFICATIVA.....	45
4. OBJETIVOS.....	46
4.1 OBJETIVO GERAL.....	46
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
5.1 TIPO DE ESTUDO.....	47
5.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	47
5.3 LOCAL DO ESTUDO.....	47
5.4. POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	47
5.4.1 Critérios de Inclusão.....	48
5.4.2 Critérios de Exclusão.....	48
5.4.3 Coleta de Dados.....	48
5.4.4 Coleta de Material Biológico - HUMANO.....	48
5.4.5 Coleta de Material Biológico - BACTERIANO.....	49
5.4.5.1 Testes de Susceptibilidade aos Antimicrobianos.....	49
5.4.5.2. Determinação da Sequência-Tipo dos Isolados (ST).....	51
5.5 DETERMINAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS.....	51
5.5.1. Análise Estatística.....	58
5.6 ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES BACTERIANOS.....	58
5.6.1 Virulência Bacteriana.....	58
5.6.2 Extração e Quantificação de Cápsula Polissacarídica (CPS).....	59
5.6.3 Resistência Bacteriana.....	60
5.6.4 Purificação e Sequenciamento dos Produtos de PCR.....	61
6. RESULTADOS.....	62
7. DISCUSSÃO.....	65
8. CONCLUSÃO.....	71
9. REFERÊNCIAS.....	73
APÊNDICES:.....	97

# 1. INTRODUÇÃO

A resposta imune tem papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos e se constitui o principal impedimento para a ocorrência de infecções disseminadas, habitualmente associadas com alto índice de mortalidade. É também conhecido o fato de que, para a quase-totalidade das doenças infecciosas, o número de indivíduos expostos à infecção é bem superior ao dos que apresentam doença, indicando que a maioria das pessoas tem condições de destruir esses microrganismos e impedir a progressão da infecção. Em contraste, as deficiências imunológicas, sejam da imunidade inata (disfunções de células fagocíticas) ou da imunidade adaptativa (deficiência de produção de anticorpos ou deficiência da função de células T), são fortemente associadas com aumento de susceptibilidade a infecções (Beceiro et al., 2011).

Dentre os patógenos mais frequentes causando infecção hospitalar nos pacientes internados, destaca-se a *Klebsiella pneumoniae*, que muitas vezes pode ser considerada com um problema de Saúde Pública, provocando bacteremia e septicemia, devido a sua prevalência e resistência antimicrobiana relacionado à mortalidade e morbidade em unidades de tratamento intensivo, principalmente neonatais. Além disso, podem sobreviver no ambiente e também, transitoriamente, nas mãos de pessoas que manipulam os pacientes (BrCast 2018; ANVISA, 2018). O tratamento de infecções causadas por isolados de *K. pneumoniae* pode apresentar dificuldade devido a possibilidade de aquisição de resistência a agentes antimicrobianos, incluindo os de amplo espectro, além da resistência intrínseca a ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina (BrCast 2018; ANVISA, 2018).

A capacidade da *K. pneumoniae* de prosperar no ambiente e em diferentes locais do corpo está relacionada em grande parte, a sua capacidade intrínseca para regular a expressão de vários fatores de virulência que contribuem para patogênese bacteriana, incluindo as adesinas fimbriais, sideróforos e antígenos capsulares (Khaertynov et al., 2018).

As células da resposta imune são também as principais fontes de citocinas e quimiocinas no início das infecções, as quais exercem sua ação tanto na fase inata como na adaptativa. As quimiocinas, devido a seu papel de atrair células para o sítio da lesão, são muito importantes no processo de defesa do hospedeiro (Schulte et al., 2013; Chaudhry et al., 2013).



A despeito da importância da resposta imune, a dificuldade em controlar a resposta inflamatória que se desenvolve pode provocar dano nos próprios tecidos, muitas vezes limitado e sem maiores consequências para o hospedeiro. Porém, eventualmente, infecções causadas por bactérias gram negativas podem resultar em septicemia e choque séptico, situação extremamente grave e associada com alta taxa de mortalidade. O choque séptico é desencadeado por lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede bacteriana estimulando nos neutrófilos, macrófagos, células endoteliais e músculos uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias como: Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleucina1 (IL1), IL6 e IL8, além de Oxido Nítrico (NO). Como consequência, há diminuição do tônus muscular e do débito cardíaco, que resulta em hipotensão e má perfusão tecidual, e finalmente morte celular. No entanto, a modulação dessa resposta exacerbada pode ser obtida. Assim, em modelo experimental a administração concomitante de IL10 e LPS protege camundongos da morte por choque séptico, ao inibir a produção de IL12 e síntese de IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  (Schulte et al., 2013; Chaudhry et al., 2013).

Ao longo dos anos, tornou-se cada vez mais evidente que a variação genética individual é um componente essencial de respostas imunes em geral, que contribui para suscetibilidade, evolução, e desfecho de doenças infecciosas e autoimunes, além de câncer. Inúmeros estudos revelaram a extensão da variação genética humana enquanto tentavam mapear seu papel em doenças multifatoriais e poligênicas (Schulte et al., 2013). Dessa forma, pesquisas envolvendo SNPs funcionais têm mostrado associação entre a ocorrência de SNPs e suscetibilidade a diversas doenças, incluindo-se as doenças infecciosas, autoimunes e inflamatórias (inflamação crônica) (Zeng et al., 2009; Schulte et al., 2013; Holub et al., 2013).

O objetivo do presente trabalho foi identificar polimorfismos nos genes *TNF $\alpha$* , *IL1 $\beta$* , *IL6* e *IL10* que estão relacionados com a susceptibilidade dos pacientes em desenvolver infecções hospitalares, e quais fatores de virulência estão presentes nesses patógenos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

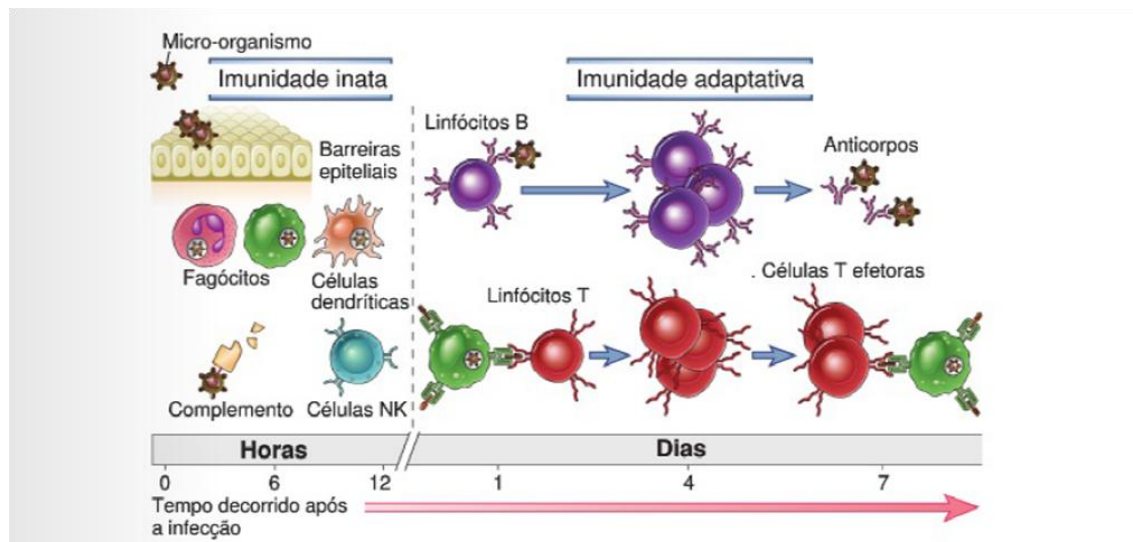
### 2.1 PECULIARIDADE DAS INFECÇÕES HOSPITALARES

#### 2.1.1 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO

O sistema imunológico é constituído por uma complexa rede de órgãos, células e moléculas, e tem por finalidade manter a homeostase do organismo, combatendo as agressões em geral. A imunidade inata atua em conjunto com a imunidade adaptativa e caracteriza-se pela rápida resposta à agressão, independentemente de estímulo prévio, sendo a primeira linha de defesa do organismo. Seus mecanismos compreendem barreiras físicas, químicas e biológicas, componentes celulares e moléculas solúveis. A primeira defesa do organismo frente a um dano tecidual envolve diversas etapas intimamente integradas e constituídas pelos diferentes componentes desse sistema (Liu et al., 2016; Gowin et al., 2018).

O sistema imune atua como sistema integrado de defesa do hospedeiro para eliminar o agente infeccioso e oferecer proteção duradoura. Por outro lado, os microrganismos apresentam ou desenvolvem mecanismos de evasão que podem levar à infecção ou à lesão tecidual. A resposta imune à infecção ocorre em três fases (Sarno et al., 1991; Moreira et al., 1993; Mims et al., 2005) (Figura 01):

Figura 01: Imunidade inata e adaptativa após exposição ao patógeno



Fonte: BioClassi et al 2019

Legenda: Os mecanismos da imunidade inata fornecem a defesa inicial contra infecções. A resposta imune adaptativa desenvolvendo-se posteriormente e consiste na ativação dos linfócitos. A cinética das respostas imunológicas inatas e adaptativa é uma estimativa e pode variar em diferentes infecções.

✓ **Imunidade inata:** que corresponde a primeira barreira para eliminar o organismo invasor, ativada imediatamente após a invasão deste organismo (até 4 horas), de resposta rápida e não específica aos antígenos. Fazem parte da imunidade inata o sistema complemento, macrófagos, proteínas de fase aguda, células fagocíticas e natural killer (NK). Quando esta linha de defesa é ultrapassada, a resposta imune adaptativa atua, gerando células antígeno-específicas e células de memória que impedem a infecção por aquele agente (Mims et al., 2005);

✓ **Resposta induzida:** precocemente, que não gera proteção duradoura (4 a 96 horas), entretanto pode repelir o microrganismo ou mantê-lo sob controle até que ocorra a resposta adaptativa. As citocinas produzidas durante esta fase atuam no desenvolvimento da resposta adaptativa e podem determinar se a resposta será predominantemente humoral mediada por anticorpos, ou celular mediada por células T (Mims et al., 2005);

✓ **Resposta adaptativa ou específica:** que ocorre após 96 horas e compreende a resposta de anticorpos e linfócitos T e perdura durante muitas vezes por toda a vida do hospedeiro, uma vez que o corpo produza anticorpos contra um determinado patógeno, vírus na maioria dos casos, quando o hospedeiro for reexposto a esse agente, os anticorpos serão prontamente ativados (Mims et al., 2005).

## **RESPOSTA HUMORAL**

Muitas bactérias importantes nas doenças infecciosas humanas se multiplicam nos espaços extracelulares do organismo, e a maior parte dos patógenos intracelulares se dissemina de uma célula para outra através dos fluidos extracelulares. A resposta imune humoral conduz à destruição dos microrganismos extracelulares e seus produtos, como, por exemplo, as toxinas; além de também prevenir ou diminuir a disseminação das infecções intracelulares, através da neutralização desses agentes. Os anticorpos também facilitam o reconhecimento de microrganismos por células fagocitárias, permitindo que assim sejam ingeridos e digeridos, como ativam o sistema complemento, potencializando a opsonização, recrutando células inflamatórias para o local da infecção e lizando certos microrganismos pela formação dos poros em suas membranas (Molinaro, 2009; Chaudhry et al., 2013; Liu et al., 2016).

Nesta resposta, a ativação das células B e sua diferenciação em células plasmáticas secretoras de imunoglobulinas é deflagrada pelo antígeno específico e requer a participação de células CD4 Th2, que também controlam a mudança de isotipo e

desempenham papel importante na hipermutação somática, diversifica os receptores para reconhecer novos antígenos, o que é necessário para a maturação da afinidade dos anticorpos, que ocorre no curso da resposta humoral. A imunoglobulina de superfície funciona como receptor de antígenos e realiza dois papéis na ativação: a transdução de sinal direto para o interior da célula, quando se une ao antígeno e aos sítios intracelulares, para ser degradado e levado à superfície do linfócito B, onde, por sua vez, são reconhecidos por CD4 Th2 antígenos específicos. Esta resposta dependente da célula T é chamada de timo-dependente (TD). Porém, alguns antígenos, como os lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, podem ativar diretamente linfócitos B, e tal resposta é chamada de timo-independente (TI) (Molinaro, 2009; Wright et al., 2009; Gowin et al., 2018).

Anticorpos de alta afinidade neutralizam toxinas, vírus e bactérias. Mas, podem não resolver o problema, pois muitos agentes não são neutralizados pelos anticorpos e devem ser removidos por outros meios. Assim, o papel dos anticorpos nestas situações é ativar outras células (células efectoras acessórias), que tenham receptores para Fc de Imunoglobulina. Dentre essas, podemos citar macrófagos e neutrófilos, que ingerem bactérias recobertas por IgG; assim como as NK, que lisam diretamente parasitos recobertos por IgG; e ainda células infectadas com vírus, recobertas também com IgG. Tal fenômeno acontece por um mecanismo denominado citotoxicidade celular, dependente de anticorpo (ADCC). Além da ADCC, via IgG, exercida pela NK, o mesmo fenômeno pode ser observado por meio da IgE, onde as células citotóxicas são os eosinófilos, e a importância da ADCC via IgE se deve ao fato de que alguns parasitos não são mortos diretamente por fagocitose, somente através dos mediadores liberados por estas células. A IgE também participa na sensibilização e ativação de mastócitos promovendo liberação de substâncias que dilatam vasos sanguíneos e recrutam células inflamatórias (Molinaro, 2009; Van Well et al., 2013; Gowin et al., 2018).

### **2.1.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NAS INFECÇÕES**

A cascata de inflamação e ativação do sistema de coagulação associados com a deficiente fibrinólise leva a alterações na circulação microvascular podendo ocasionar disfunção orgânica, sepse grave, síndrome de disfunção múltipla de órgãos e até morte (Schlichting; Mccollam, 2007). Tal cascata pode ser estimulada por invasão de microrganismos (Holmes; Russell; Walley, 2003), e começa quando, na

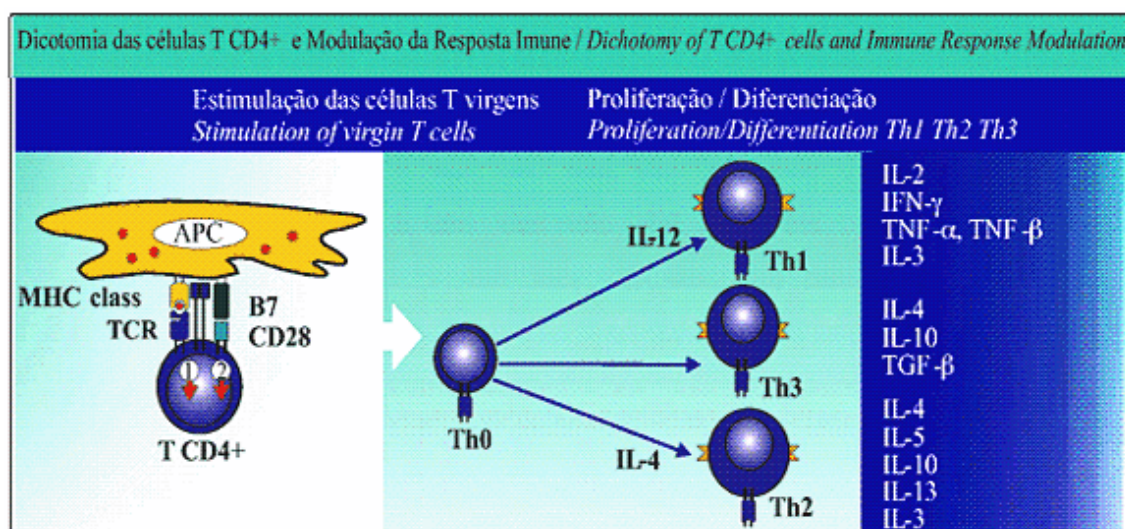
resposta a infecção, o sistema imune inato é ativado pelo reconhecimento de substâncias estranhas denominadas Padrões Moleculares Associados à Patógenos (Pamps) (Schlichting; Mccollam, 2007).

Os Pamps são produtos derivados existentes em bactérias patógenas, não patógenas e comensais. Eles incluem moléculas de superfície, tais como endotoxinas (em geral, LPS) e motivos internos que são liberados durante a lise da bactéria (Heat Shock Proteins-HSPs e fragmentos de DNA) (Adib-Conquy; Cavaiillon, 2007). Os Pamps são reconhecidos pelos Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs), que estão presentes em células do sistema imune inato e agem como sensores, e as reconhecem como sinais de perigo exógeno, como exemplo, o *CD14* (Cluster of Differentiation-14) e os *toll-likereceptors* (TLRs) (Silva; Velasco, 2007). Os PRRs desencadeiam uma via de sinalização intracelular que estimula os macrófagos a secretar citocinas inflamatórias (Schlichting; Mccollam,2007).

Citocinas são proteínas que agem de diversas formas, podendo ativar a própria célula que a produziu, assim como outras células. Seus efeitos incluem indução de proliferação, quimiotaxia, apoptose e diferenciação celular, com ação sobre diferentes tipos celulares (Silva; Velasco, 2007).

Durante a lesão a célula produz citocinas pro-inflamatórias (por exemplo,  $TNF\alpha$ ,  $TNF\beta$ , IL1 e IL6) e anti-inflamatórias (por exemplo, IL10, IL1RN, IL4, IL13) (Figura 02). Citocinas pro-inflamatórias estimulam um aumento de neutrófilos que se aderem ao endotélio e aumentam a produção de óxido nítrico (NO). Neutrófilos podem causar danos aos tecidos quando interagem com moléculas intermediárias reativas de oxigênio (ROS). Quando ROS se associam com o NO resultam na formação de peroxinitrito, que contribui para o aumento do dano celular (Holmes; Russell; Walley,2003; Schulte et al., 2013; Chaudhry et al., 2013; Liu et al., 2016).

Figura 02: Subpopulação de células T CD4+ e principais citocinas produzidas



Fonte: Machado et al 2004

Legenda: Subpopulação de células e citocinas produzidas durante a infecção.

Para controlar a resposta pro-inflamatória, a produção de uma série de moléculas imunorregulatórias, conhecidas como citocinas anti-inflamatórias, são ativadas e funcionam como um inibidor específico de citocinas pro-inflamatórias. Em geral, tais citocinas protegem o hospedeiro da resposta inflamatória sistêmica induzida por toxinas, mas deixa-o mais suscetível a diversos tipos de infecções (Silva; Velasco, 2007).

O desequilíbrio entre fatores de defesa do hospedeiro e fatores de virulência da bactéria, comum no ambiente hospitalar, em razão da terapia invasiva e do uso de antimicrobianos, pode propiciar o surgimento de um processo infeccioso. Seguida a interação do microrganismo invasor e o hospedeiro, há a ativação da resposta imune inata envolvendo tanto componentes celulares quanto humorais (Villar et al., 2004).

A interação de lipopolissacarídeos presentes em bactérias gram-negativas com receptores TLR4 acoplados com o CD14, e de peptidoglicanos presentes em bactérias gram-positivas com receptores TLR2, resulta na ativação do sistema imune inato, seguida da ativação do fator de transcrição NF-κB (Sriskandan; Altmann, 2008; Texereau et al., 2005; Saturnino; Andrade; 2007; Leaver et al., 2007; Gowin et al., 2017).

O NF-κB é um dos principais fatores de transcrição que modula a expressão de mediadores imunorregulatórios envolvidos na resposta inflamatória aguda, estimulando a transcrição de citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, sintases de óxido nítrico e componentes do sistema complemento (Silva;

Velasco, 2007; Abraham, 2005). Quando produzidas em grandes quantidades na sepse, essas citocinas pro-inflamatórias ativam fagócitos em todo o organismo, culminando em uma inflamação sistêmica (Silva; Velasco, 2007).

Para impedir danos de estresse oxidativo e do excesso de inflamação, e para manter o equilíbrio do sistema imune, ocorre a ativação da transcrição de genes com função citoprotetora (por exemplo, o HSP 70) e de genes anti-inflamatórios, que irão estimular uma redução da produção de citocinas pro-inflamatórias (Silva; Velasco, 2007).

A imunidade pode se dividir em dois tipos: a resposta inata em que participam defensas, fagócitos, a resposta *toll-like* e citocinas; e a imunidade adaptativa em que participam linfócitos T e B. A barreira mecânica, a imunidade celular e humoral que são importantes para o organismo podem ser quebradas por sondas e cateteres usados em métodos de diagnóstico e terapêutico (Hessle et al., 2005; Mogensen et al., 2006; Gowin et al., 2018). Além disso, o desenvolvimento clínico da infecção sofre efeito também de fatores ambientais que incluem algumas características da superfície do cateter, formação de biofilme, trombose, composição do sangue e a resposta imunológica (Shanks et al., 2006).

### **2.1.3 SUSCEPTIBILIDADE ÀS INFECÇÕES**

A resposta imune do hospedeiro aos microrganismos funciona como uma rede de interações com funções que frequentemente se sobrepõem, podendo muitas vezes haver redundância nos mecanismos para conter ou controlar a infecção. Por outro lado, a especialização de certos mecanismos da resposta imune contra microrganismos pode ser demonstrada em hospedeiros com imaturidade ou variabilidade genéticas ou adquiridos de funções específicas do sistema imunológico, que não os tornam universalmente suscetíveis a todas as classes de agentes infecciosos. O elo final da cadeia do processo infeccioso é o novo hospedeiro suscetível (Brouwer et al., 2009; Gowin et al., 2018; Russo et al., 2019).

A suscetibilidade do hospedeiro depende de fatores genéticos, de imunidade específica adquirida e de outros fatores que alteram a habilidade individual de resistir à infecção ou limitar a patogenicidade, como os fatores de virulência presente nos microrganismos (Brouwer et al., 2009).

A susceptibilidade a infecções bacterianas está ligada ao estado de saúde (fisiológico e imunológico) do hospedeiro bem como à virulência bacteriana subjacente (Peterson, 1996; Brouwer et al., 2009; Mesquita et al., 2010). A resistência do hospedeiro a infecções é mantida pelo sistema imunitário íntegro assim como pelas linhas celulares que intervêm no processo de fagocitose (Peterson, 1996; Brouwer et al., 2009). Um indivíduo poderá tornar-se susceptível a infecções mediante situações de trauma (lesões da pele e mucosas, especialmente situações graves de queimaduras e feridas cirúrgicas contaminadas), procedimentos invasivos (intubação traqueal e cateterização sanguínea e uretral) e no decurso de determinadas doenças (Peterson, 1996; Brouwer et al., 2009). A Síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) é um exemplo de susceptibilidade devido ao facto dos linfócitos T auxiliares CD4+ serem destruídos pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Peterson, 1996). Outro exemplo, é o do envelhecimento que implica um comprometimento progressivo dos sistemas de defesa, específicos e não específicos (Peterson, 1996). As crianças também demonstram alguma vulnerabilidade a determinados agentes patogénicos (*Streptococcus B*, por exemplo) visto que o seu sistema imunitário ainda não se encontra completamente desenvolvido, pelo que a sua ação protetora poderá não ser suficientemente resistente face aos antígenos (Ag) bacterianos (Peterson, 1996; Mesquita et al., 2010). Também existem variabilidade genéticas (polimorfismo genético), no que diz respeito ao sistema do complemento ou das defesas celulares tais como a incapacidade dos neutrófilos polimorfonucleares matarem as bactérias, que tornam os indivíduos mais predispostos para infecções (Peterson, 1996). Além disso, os pacientes que apresentam granulocitopenia na sequência de uma doença (cancro) ou terapêutica imunossupressora (quimioterapia direcionada para a doença oncológica ou para os transplantes de órgãos) (Peterson, 1996). Os doentes com fibrose cística também podem mais facilmente desenvolver infecções como resultado da disfunção da atividade ciliar e da remoção efetiva do muco (Peterson, 1996). As obstruções urinárias também se mostram fatores predisponentes para a ocorrência de infecções urinárias com a bactéria *Escherichia coli* (Peterson, 1996).

Um exemplo da importância da resposta a antígenos T independentes é a imunidade humoral frente a polissacarídeos bacterianos, um mecanismo decisivo na defesa do hospedeiro contra infecções por bactérias encapsuladas. Por essa razão, indivíduos com deficiências congénitas ou adquiridas que prejudiquem a resposta humoral são especialmente suscetíveis a infecções, muitas vezes fatais, por bactérias encapsuladas (Brouwer et al., 2009; Mesquita et al., 2010).



## 2.2 VARIANTES GENÉTICA ASSOCIADA COM SUSCEPTIBILIDADE A INFECCÃO

Ao longo dos últimos anos, tornou-se cada vez mais evidente que a variação genética individual é um componente essencial de respostas imunes em geral, que contribui para suscetibilidade, evolução, e desfecho de doenças infecciosas e autoimunes, além de câncer. Inúmeros estudos revelaram a extensão da variação genética humana enquanto tentavam mapear seu papel em doenças multifatoriais e poligênicas.

Polimorfismo genético é a denominação dada à coexistência de mais de uma forma variante de um gene num dado *locus*, na frequência acima de 1-2%, na constituição genética de uma população (DE Nardin, 2009). Os mais comuns incluem segmentos repetidos *in tandem* (nucleotídeos de mini e microsátélites), deleções/inserções/duplicações de segmentos pequenos ou grandes (variantes do número de cópias) e polimorfismos de nucleotídeo único (Chorley et al., 2008).

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são sítios no genoma onde a sequência de DNA de uma porcentagem de indivíduos da população difere por uma única base (DE Nardin, 2009). A base de dados de SNPs do National Center for Biotechnology Information (NCBI) lista mais de 11 milhões de SNPs identificados na população humana, sendo que a maioria dos polimorfismos comuns tem pequeno impacto sobre a saúde humana. Porém, recentes evidências mostram que determinadas variantes podem influenciar na suscetibilidade a doenças (Chorley et al., 2008). Dessa forma, nos últimos anos, pesquisas envolvendo SNPs funcionais em genes de imunidade têm mostrado associação entre a suscetibilidade a diversas doenças, incluindo-se as doenças infecciosas, autoimunes e inflamatórias (inflamação crônica) (Dutra et al., 2009; Kubistova et al., 2009; Gregersen; Olsson, 2009).

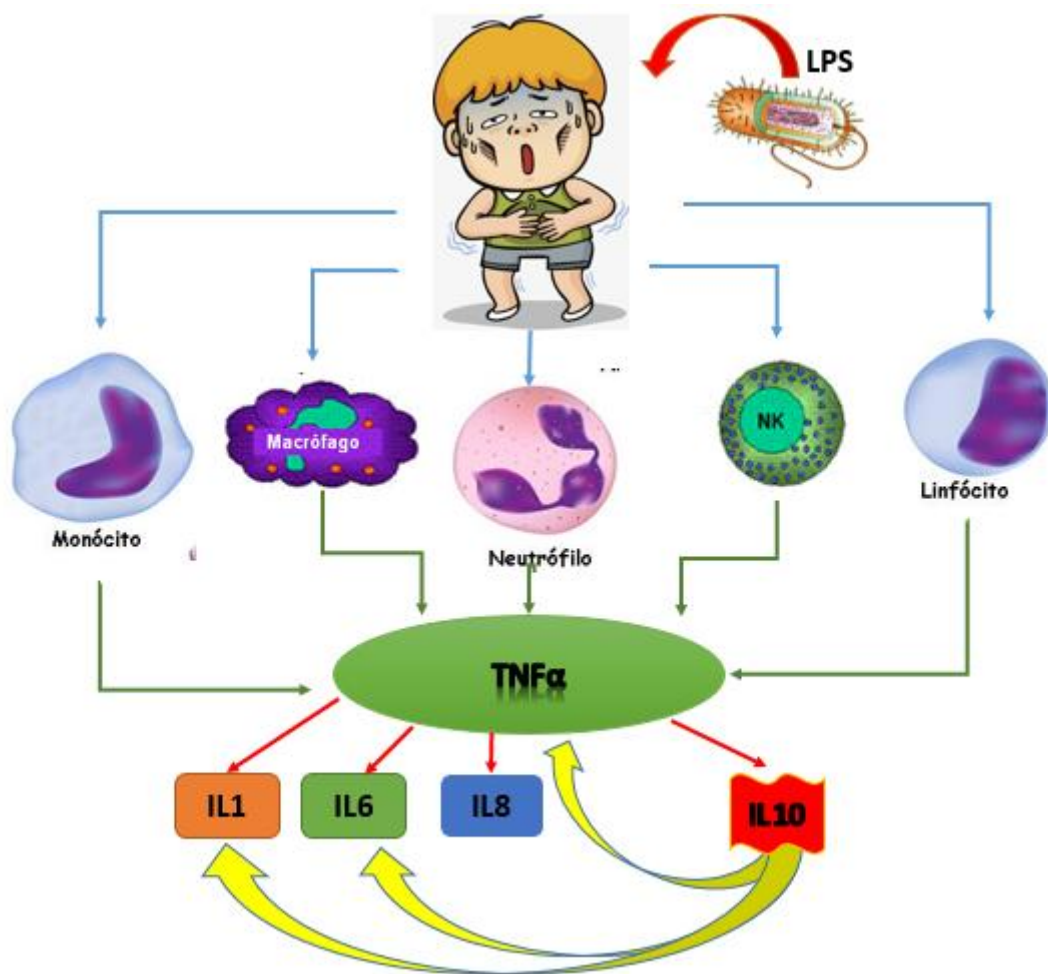
### **Fator de Necrose Tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ )**

O TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) tem um papel importante na patogênese da resposta inflamatória aguda, e estudos mostram relação do alto nível de TNF $\alpha$  com a gravidade da sepse (Holmes; Russell; Walley, 2003). Além de induzir a expressão das moléculas de adesão no endotélio vascular dentro das áreas infectadas, o TNF $\alpha$  também induz as células endoteliais a produzir moléculas como o fator ativador plaquetário, que pode desencadear a coagulação do sangue e o bloqueio dos vasos sanguíneos locais. Isso restringe o extravasamento do plasma e impede os patógenos

de entrarem no sangue e disseminar a infecção pelo corpo. Porém nos casos em que a infecção se dissemina no sangue, as próprias ações do TNF $\alpha$  que contém a infecção local tão efetivamente podem tornar-se catastróficas (Parham,2001).

O TNF $\alpha$  produzido por monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, NK e linfócitos T, é a primeira citocina liberada em resposta a endotoxina, atingindo níveis séricos máximos em uma a duas horas após a infusão de LPS, podendo induzir a liberação de IL1, IL6, IL8, IL10 (Figura 03), expressão do receptor antagonista de IL1 (IL1RN) e receptor solúvel de TNF (TNFR solúvel) (Silva; Velasco,2007).

Figura 03: Citocinas ativadas após a exposição ao LPS bacterianos



Fonte: Do autor.

Legenda: Após duas horas de exposição ao LPS presente nas paredes bacterianas o sistema imunológico dos hospedeiros chega ao pico máximo de produção do TNF $\alpha$ , que induz a produção de IL1, IL6 e IL8. Essas citocinas induzem a produção de IL10 que vai atuar anti o processo inflamatório.

O loco gênico do gene *TNF $\alpha$*  está posicionado próximo ao *TNF $\beta$* . O SNP na região -308 parece possuir ter uma significância funcional por afetar a regulação do

*TNF $\alpha$*  em nível transcricional (Malleo et al., 2007). Tal polimorfismo presente na região promotora consiste de um G (*TNF $\alpha$  -308G*) no alelo mais frequente e um A (*TNF $\alpha$  -308 A*) no alelo incomum (mutante), o que pode modificar sua expressão gênica (Holmes; Russell; Walley, 2003). O alelo *ATNF $\alpha$  -308*, revisto por Malleo e colaboradores (2007), é considerado como um potente ativador de transcrição (o que resulta em níveis elevados de *TNF $\alpha$* ), e está correlacionado com alta taxa de morbidade e mortalidade em muitas doenças inflamatórias e auto-imunes, e inclusive em choque séptico.

### **Interleucina1 (IL1)**

A IL1 (um termo usado para uma família de proteínas, incluindo IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) (Dinarello et al., 2010) está entre as citocinas mais estudadas na fisiopatologia da sepse. São citocinas pro-inflamatórias poderosas que implicam em um grande número de doenças inflamatórias infecciosas e não infecciosas, incluindo a aterosclerose (Jawien, 2008), artrite reumatoide (Choy, 2012), osteoartrite (Kapoor et al., 2011) e Doença de Alzheimer (Perez; Ruiz, 2012). A IL1 começa a ser liberada principalmente de macrófagos ativados de maneira oportuna semelhante ao *TNF $\alpha$* , sinaliza através de dois receptores distintos, denominados: Receptor de IL1 tipo I (IL1R1) e IL1R2, e tem comparáveis efeitos a favor das células imunológicas (Dinarello et al., 1997; O'Neill 2008).

IL1 e *TNF $\alpha$*  atuam sinergicamente para induzir um estado de choque caracterizado pela permeabilidade vascular, doença pulmonar edema e hemorragia (Schute et al., 2013). Importante, *TNF $\alpha$*  e IL1 também foram identificados como mediadores fundamentais para o desenvolvimento de febre e, portanto, pertencem a um grupo de citocinas pirogênicas (Dinarello 2004).

A IL1 $\beta$  é um membro da família de citocinas interleucina1. Esta citocina é produzida por macrófagos ativados como uma proteína, que é processada proteoliticamente em sua forma ativa pela caspase-1. IL1 $\beta$  é um importante mediador da resposta inflamatória, e está envolvido em uma variedade de atividades celulares, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose. O papel da IL1 $\beta$  na sepse não foi extensivamente estudado. Mera e colaboradores relatou que após a medição simultânea de 17 citocinas durante os primeiros sete dias após a admissão de doentes com sépsis, a IL1 $\beta$  exibiu aumentos persistentes naqueles que morreram (Mera et al., 2011), sugerindo que a IL1 $\beta$  pode ter um papel na sepse.

O papel de IL1 e TNF $\alpha$  na sepse foi demonstrado em vários relatos, incluindo tanto modelos experimentais de choque séptico em animais quanto em humanos com sepse. A administração de endotoxina bacteriana resulta na produção e liberação de IL1 e TNF $\alpha$  na circulação sistêmica, onde os picos de concentração são detectados 60 a 90 minutos após a administração de LPS (Cannon et al., 1990; Hesse et al., 1988; Michie et al., 1988; Suffredini et al., 1989). Uma vez liberadas, IL1 e TNF $\alpha$  atuam em diferentes células-alvo, como macrófagos, endoteliais células e neutrófilos. O TNF $\alpha$  leva a uma produção aumentada de macrófagos (Fahlman et al., 1994), promove a ativação e diferenciação de macrófagos (Witsell et al., 1992), e prolonga sua sobrevivência (Conte et al., 2006). Todos estes efeitos aumentam o efeito pró-inflamatório em respostas à sepse. A IL1 e o TNF $\alpha$  também aumentam a adesividade da integrinas nos neutrófilos e promove seu extravasamento nos tecidos. Essas citocinas pro-inflamatórias foram identificadas como os principais mediadores da inflamação, induzindo a ativação da coagulação, com o TNF $\alpha$  tendo uma potente ação reguladora sobre a expressão endotelial de pró-coagulante (Schoute et al., 2008). Além disso, IL1 e TNF $\alpha$  amplificam em cascatas inflamatórias em uma forma autócrina e parácrina ativando macrófagos para secretar outras citocinas pró-inflamatórias (IL6, IL8 e MIF), mediadores lipídicos e oxigênio e nitrogênio reativos (Fong et al., 1989; Schute et al., 2013), levando à disfunção orgânica induzida por sepse.

### **Interleucina6 (IL6)**

A IL6 é uma glicoproteína de 21kDa produzida por uma variedade de células, especialmente macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas em resposta à estimulação com LPS, IL1 e TNF $\alpha$  (Schulte et al., 2013). Concentrações elevadas de IL6 são encontradas em muitas condições agudas, como queimaduras, grandes cirurgias e sepse ocorre picos de IL6 subsequente às concentrações de TNF $\alpha$  e IL1. Os níveis plasmáticos de IL6 estão estavelmente elevados nestas condições e correlacionar com muitos indicadores de doença grave, como ensaios clínicos, estresse após a cirurgia e trauma, a ocorrência de falha de múltiplos órgãos e choque séptico, e a mortalidade geral (Schulte et al., 2013)

A IL6 possui uma variedade de efeitos biológicos, incluindo a ativação dos linfócitos B e T e do sistema de coagulação, e a modulação da hematopoiese (Schulte et al., 2013; Liu et al., 2016). Em contraste a TNF $\alpha$  e IL1, a injeção de IL6 por si só não produzir um estado semelhante a sepse (Liu et al., 2016). Uma função chave da IL6 é a

indução de febre e a mediação da resposta de fase aguda, uma reação sistêmica e um estímulo que é caracterizado por febre, leucocitose e liberação de proteínas da fase aguda hepática, como a proteína C-reativa, componentes do complemento, fibrinogênio e ferritina estudos *in vivo* em camundongos com IL6 demonstraram que a deleção do gene IL6 diminui a inflamação pulmonar em um modelo de lesão pulmonar aguda e protege da mortalidade e do desenvolvimento de falência de órgãos em inflamação peritoneal aguda (Schulte et al., 2013; Liu et al., 2016). Posteriormente, Pathan e colaboradores mostraram que a IL6 causa diminuição da atividade miocárdica na doença meningocócica (Pathan et al., 2004). Disfunção miocárdica em choque séptico leva à perfusão tissular prejudicada, múltiplo órgãos e leva a morte. Apesar de suas propriedades pró-inflamatórias, a IL6 também foi relacionada a respostas anti-inflamatórias. A IL6 inibe a liberação de TNF $\alpha$  e IL1 e aumenta os níveis circulatórios de mediadores anti-inflamatórios, como como IL1Ra, TNFRs, IL10, TGF $\beta$  e cortisol (Chaudhry et al., 2013; Schulte et al., 2013).

Um efeito protetor da IL6 foi mostrado em um experimento utilizando endotoxemia (Yoshizawa et al., 1996; Xing et al., 1998), enquanto que modelos com deleção do gene IL6, não alteram a mortalidade em um modelo de sepse polimicrobiana induzida por ligadura e perfuração cecal.

Variantes genéticas na região promotora têm a função de regular a produção de IL6 circulante, podendo influenciar a atividade do gene *IL6 in vivo* (Barber et al., 2006; Chaudhry et al., 2013;). Na região promotora do gene *IL6*, encontrado no cromossomo 7, há um polimorfismo com mudança de G para C na posição -174 (Holmes; Russell; Walley, 2003; Müller-Steinhardt; Ebel; Hartel, 2007) e outro na posição -597 com mudança de G para A (Müller-Steinhardt; Ebel; Hartel, 2007).

Tischendorf e colaboradores (2007) concluíram que o polimorfismo *IL6 -174 A/G* está associado com choque séptico, sendo que o alelo C está correlacionado com baixos níveis séricos de *IL6* em pacientes, e o inverso ocorre em *ex-vivo* depois do estímulo com LPS. O genótipo -174 GG foi associado à melhora na sobrevivência de pacientes sépticos. Entretanto o seu papel, em relação ao SIRS (Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica), sepse e choque séptico ainda não está claro (Sutherland et al., 2005; Chaudhry et al., 2013;).

A interleucina 6 tem papel importante na sepse e causa a secreção de proteínas de fase aguda e ativação de células B. Os altos níveis de *IL6* no plasma estão relacionados com choque séptico (Hörner et al., 2007).

## **Interleucina10 (IL10)**

A IL10 é uma citocina homodimérica de 35 kDa que é produzida por muitos tipos de células do sistema imunológico, como monócitos, macrófagos, linfócitos B e T e células NK (Latifi et al., 2002). Vários estudos funcionais têm revelado as funções anti-inflamatórias da IL10. *In vitro*, a IL10 suprime a produção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF $\alpha$ , IL1, IL6, IFN $\gamma$  e GM-CSF, em células imunes durante a sepse (Malefyt et al., 1991; Fiorentino et al., 1991). Além disso, *in vivo* a IL10 estimula a produção de IL1Ra e TNFRs, neutralizando assim o efeito pró-inflamatório de IL1 e do TNF $\alpha$  (Seitz et al., 1995; Schulte et al., 2013).

A IL10 é uma citocina supressora e tem a função de inibir as respostas pró-inflamatórias da imunidade inata e adaptativa, bem como previne lesões teciduais causada por respostas imunes adaptativas exacerbadas. Assim, a IL10 é muitas vezes descrita como uma citocina central durante a fase de resolução de uma resposta inflamatória. No entanto, por outro lado, patógenos evolutivamente exploraram as funções da IL10 de reprimir a resposta inflamatória normal do hospedeiro durante as infecções, estabelecendo estados infecciosos crônicos. Por exemplo, o aumento da expressão de IL10 tem sido associado a muitas infecções bacterianas e virais crônicas; de fato, alguns vírus podem produzir IL10 para suprimir diretamente respostas do sistema imunológico do hospedeiro (Hazlett et al. 2014). Especificamente, a indução de IL10 em células dendríticas (DCs) e macrófagos representam um poderoso mecanismo de evasão imune utilizado por vários patógenos. A própria IL10 ou a subsequente indução de células T auxiliares prejudicam o controle do patógeno na infecção em modelos utilizando o *Mycobacterium tuberculosis* (Hazlett et al. 2014).

Tem sido relatado que a IL10 é um dos fatores críticos na fisiopatologia da sepse (Wu et al., 2009). Medições de citocinas séricas em pacientes com sepse, indicou que o nível de IL10 foi significativamente maior do que na ausência de sepse (Surbatovic et al., 2007; Rau et al., 2010). Os níveis aumentados de IL10 no soro foram correlacionados com o escore de sepse e morte. Um alto nível de IL10 relacionado ao TNF $\alpha$  foi associada à morte. Além disso, superprodução persistente de IL10 é o principal fator de risco para gravidade da sepse e desfecho fatal (Hazlett et al., 2014), sugerindo que pacientes com sepse estão em profunda imunossupressão.

A IL10 diminui a produção de IL1, IL6 e TNF $\alpha$  pelos monócitos. Mudanças nos níveis séricos de IL10 indicam mau prognóstico em pacientes com SIRS

(Holmes; Russell; Walley, 2003). Foram identificados três SNPs na região promotora, nas seguintes posições: *-1082 G/A*, *-819T/C* e *-592 A/C* (Zhang et al., 2005). Garnacho-montero e colaboradores mostraram que pacientes homocigotos GG para o polimorfismo na região -1082 apresentam uma maior concentração sérica de IL10, enquanto que o alelo A do SNP da região -1082 está associado com uma diminuição da produção de IL10 (Wattanathum et al., 2005).

Análise do polimorfismo -1082A/G no promotor do gene da IL10 demonstrou que o genótipo A/A foi associado com menor produção sérica de IL10 quando estimulada por LPS em células mononucleares do sangue de doadores saudáveis, e uma maior produção sérica de IL10 foi identificada em pacientes com pelo menos uma cópia do alelo G de IL10 -1082 com sepse (Chaudhry et al., 2013). Em comparação com controles saudáveis, a frequência do alelo A foi maior em pacientes com sepse grave, enquanto os pacientes sobreviventes tiveram menor frequência do alelo G. Houve uma associação entre aumento da produção de IL10 e mau resultado de sepse (Stanilova et al., 2006). Estes resultados indicaram que o polimorfismo alelo A do gene IL10 -1082 está relacionado a suscetibilidade à sepse, enquanto o alelo G está relacionado ao aumento da produção de IL10 e maior mortalidade na sepse (Chaudhry et al., 2013).

### **2.3 AGENTES INFECCIOSOS**

A ordem *Enterobacteriales* é o maior e mais heterogêneo grupo de bactérias Gram negativas de importância médica, sendo considerados 42 gêneros e centenas de espécies (Adeolu et al., 2016). Os membros dessa ordem, em sua maioria, são bacilos não esporulados, não produtores da enzima citocromo oxidase, podendo apresentar motilidade, fermentar glicose com ou sem produção de gás e reduzir nitrato a nitrito. Os microrganismos deste grupo crescem bem em meios básicos (caldo peptona), meios ricos (Ágar sangue, Ágar chocolate) e em meios seletivos (Mac Conkey, EMB), são aeróbios facultativos, ou seja, crescem bem em aerobiose e anaerobiose (ANVISA, 2010; Adeolu et al., 2016).

As bactérias dessa ordem estão distribuídas na natureza e podem ser encontradas em plantas, solo, água e microbiota normal do trato intestinal de animais e seres humanos. Podem estar associadas com infecções na comunidade e nos hospitais, causada por patógenos oportunistas ou não. Muitas espécies são causadoras de infecções urinárias,

intestinais, feridas cirúrgicas, abscessos, pneumonia, sepses e meningite (ANVISA, 2010; Farmer III, et al., 2007; Adeolu et al., 2016).

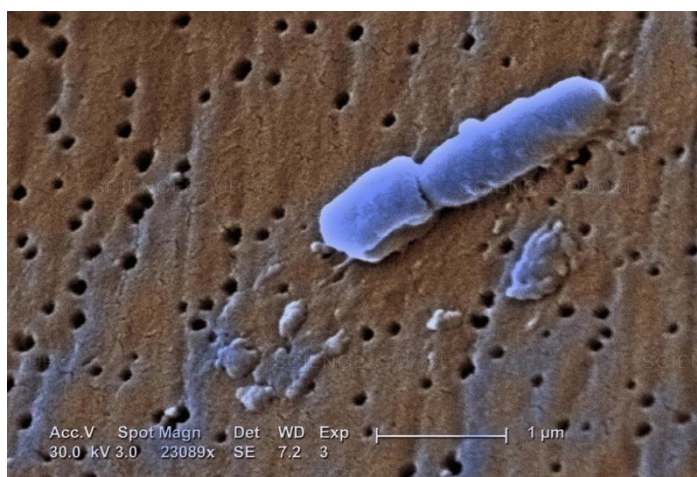
As enterobactérias constituem 80% das bactérias isoladas nos laboratórios de microbiologia. Estas bactérias são responsáveis por, aproximadamente, 50% dos casos de sepsis, mais que 70% dos casos de infecção do trato urinário e uma porcentagem significativa de infecções intestinais (ANVISA, 2010; Farmer III, et al., 2007; Adeolu et al., 2016).

Essa ordem abriga os principais agentes etiológicos causadores de infecções hospitalares, dentre eles a *K. pneumoniae*, sendo considerada um problema de Saúde Pública, devido a sua prevalência e alto grau de resistência antimicrobiana relacionado à mortalidade (Hirsch EB, et al., 2010; ANVISA, 2017; Adeolu et al., 2016; CLSI, 2018; EUCAST, 2018).

A *K. pneumoniae* (Figura 04) é um bastonete Gram negativo que apresenta uma cápsula de polissacarídeo revestindo toda a superfície da célula, o que confere resistência contra os efeitos do sistema complemento e contra a ação de fagócitos do hospedeiro. Essa cápsula juntamente com o lipopolissacarídeo e a aderência mediada pelo *pillus* são, dentre outros, importantes fatores de virulência presente nos isolados de *K. pneumoniae* (Russo et al., 2019). Este microrganismo é anaeróbico facultativo, utiliza o citrato como fonte de carbono para o seu crescimento e apresenta produção de gás, e de urease (O'Hara et al., 2005). A bactéria *K. pneumoniae* é um importante patógeno nosocomial, estando frequentemente relacionada a mortalidade e morbidade em unidades de tratamento intensivo, principalmente neonatais, provocando bacteremia e septicemia. Além disso, pode sobreviver no ambiente e também, transitoriamente, nas mãos de pessoas que manipulam os pacientes (Ben-Hamouda, 2011; ANVISA, 2017). O tratamento de infecções causadas por isolados de *K. pneumoniae* pode apresentar dificuldade devido a possibilidade de aquisição de resistência a agentes antimicrobianos, incluindo os de amplo espectro, além da resistência intrínseca a ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina (ANVISA, 2017; Russo et al., 2019).



Figura 04: *Klebsiella pneumoniae* em microscopia eletrônica.



Fonte: CDC / Science Source, 2019

Em pacientes hospitalizados pode ocorrer um aumento da prevalência da colonização para 77% em amostra de fezes e 19% na secreção de nasofaringe. Essa colonização pode ser fonte de infecções em indivíduos imunocomprometidos hospitalizados. O trato urinário de crianças e adultos é o sítio mais acometido por infecções causadas por *K. pneumoniae*, seguido por infecções pulmonares graves, septicemias, além de meningites em lactentes. *K. pneumoniae* é responsável por uma variedade de infecções, tais como pneumonia, septicemia, infecções urinárias e pulmonares, apresentando relevância crescente nas infecções hospitalares, na condição de patógeno oportunista, frequentemente causando infecções em pacientes imunocomprometidos (Khaertynov et al., 2018; Russo et al., 2019).

Além disso, também, tem sido relatada causando abscessos hepáticos (Liu et al., 2013; Moore et al., 2013), além de estar relacionada as pneumonias associadas a ventilação mecânica (Jones et al., 2010) e também a infecções do trato urinário associadas ao uso de cateteres (Frank et al., 2009). A utilização cada vez mais generalizada de antibióticos contribuiu para que *K. pneumoniae* com fenótipo de multidroga-resistência fosse uma importante causa de infecções relacionadas à assistência à saúde (IrAS) em pacientes imunocomprometidos, sendo responsável por aproximadamente 8% das infecções hospitalares (Wilksch et al., 2011).

A capacidade *K. pneumoniae* para prosperar no ambiente e em diferentes locais do corpo está relacionada em grande parte, a sua capacidade intrínseca para regular a expressão de vários fatores de virulência (Matatov et al., 1999; Sahly et al., 2000). *K. pneumoniae* produz fatores de virulência que contribuem para patogênese bacteriana,

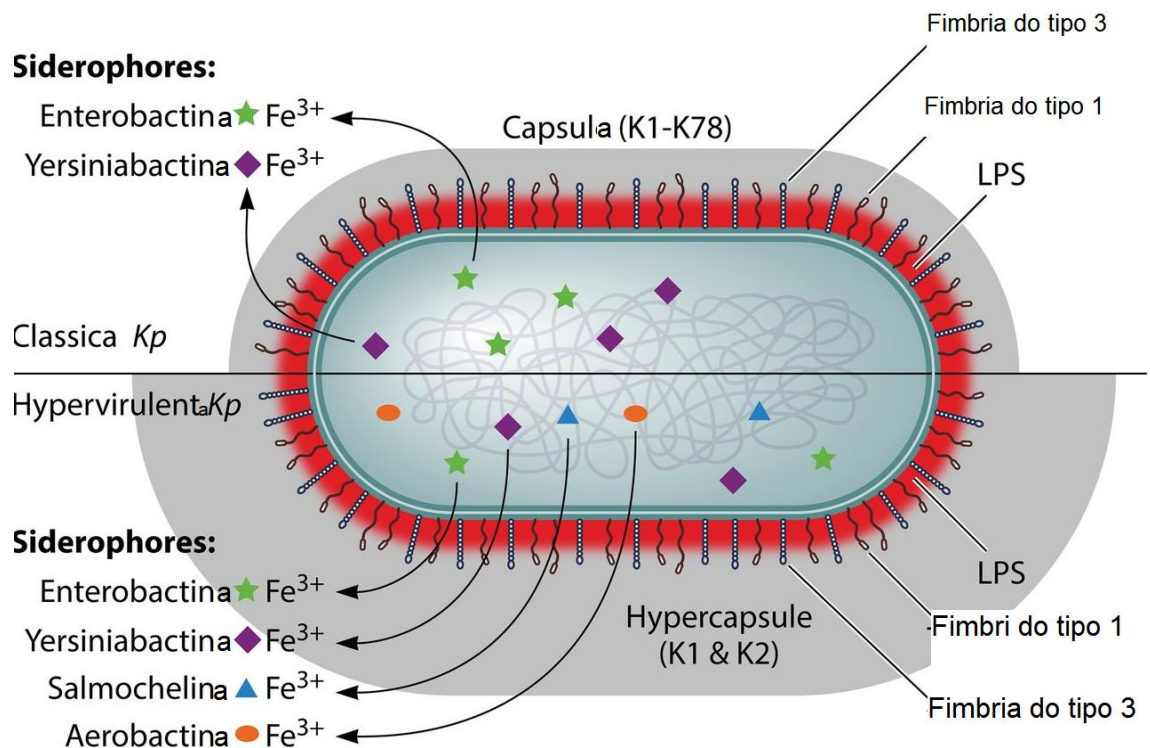
incluindo as adesinas fimbriais, sideróforos, antígenos S e antígenos capsulares (Russo et al., 2019; Ali et al., 2019). Os fatores de virulência que predominam em *K. pneumoniae* são a produção de cápsula polissacarídica e as fímbrias (Xu et al., 2018; Russo et al., 2019).

### **2.3.1 FATORES DE VIRULÊNCIA**

A maioria das espécies bacterianas são patógenos oportunistas, que infectam principalmente indivíduos imunocomprometidos, que sofrem de doenças subjacentes graves, sendo responsável por alta taxa de mortalidade (Schembri et al., 2005; Xu et al., 2018; Russo et al., 2019). Fatores como: lipopolissacarídeos, sistemas de captação de ferro, adesinas fimbriais e não fimbriais, produção de biofilme e a cápsula polissacarídica são comumente associados com a virulência pelas bactérias (Figura 05) (Xu et al., 2018; Russo et al., 2019; Ali et al., 2019).

Virulência é a capacidade patogênica de um microrganismo causar doença/lesão no hospedeiro. Já para alguns autores, a virulência vai bem mais além do que a simples capacidade de causar doença, ela está diretamente relacionada com a mortalidade produzida por aquele patógeno (Schembri et al., 2005, Wu et al., 2010). Apesar da discordância no conceito preciso do que venha ser a virulência, é de senso comum que o desfecho clínico de um paciente está relacionado com sua condição imunológica no momento do contato com o patógeno e com os possíveis fatores de virulência que esse patógeno apresenta (Schembri et al., 2005; Wu et al., 2010). Cada patógeno carrega consigo sua patogenicidade natural e os fatores de virulência seriam propriedades que aumentariam sua virulência (Figura 05) (Xu et al., 2018; Russo et al., 2019; Ali et al., 2019).

Figura 05: Fatores de virulência em cepas clássicas e hipervirulentas



Fonte: Paczosa e Meccasb, 2019

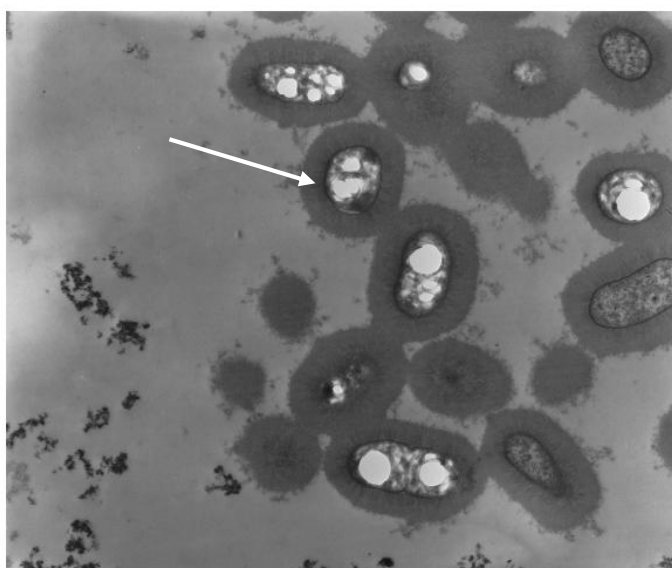
Legenda: Fatores de virulência bem caracterizados em cepas clássicas e hipervirulentas. Cepas de *K. pneumoniae* (*Kp*). Existem quatro fatores de virulência bem caracterizados para *K. pneumoniae* patogênica: cápsula, LPS, fimbrias (tipo 1 e tipo 3), e sideróforos. Cápsula é uma matriz polissacarídica extracelular que envolve as bactérias. As cepas clássicas de *K. pneumoniae* produzem uma cápsula que pode ser de qualquer um dos serotipos K1 a K78; K1 e K2 estão associados ao aumento da patogenicidade. Cepas de alta tensão formam uma hipercápsula que amplifica a produção de material capsular, resultando em uma cápsula relativamente maior, e são predominantemente do sorotipo K1, enquanto as demais cepas são do sorotipo K2. LPS, uma parte integrante parede externa, é produzida por ambas cepas de *K. pneumoniae* clássicas. Ambos os tipos de *K. pneumoniae* apresentam adesinas de membrana, fimbrias tipo 1 e tipo 3, e segregam sideróforos de eliminação de ferro.

### CÁPSULA POLISSACARÍDICA (CPS)

A cápsula polissacarídica é frequentemente denominada de cápsula, termo empregado para descrever camadas polissacarídicas, restringindo-se a uma camada que fica ligada à parede celular da bactéria como um revestimento externo de extensão limitada e estrutura definida (Figura 05 e 06) (Hsu et al., 2011; Brisse et al., 2013; Piperaki et al., 2017). A CPS consiste numa camada de superfície elaborada por polissacarídios associados, cuja composição é muito dependente do organismo, podendo ser espessa ou delgada, rígida ou flexível de acordo com sua natureza química, associando-se de maneira

compacta ou frouxa à parte externa da parede celular, onde o material capsular frouxamente associado também pode ser chamado de glicocálice. No entanto, se as camadas forem rígidas e organizadas em uma matriz compacta, que exclui partículas como a tinta naquim, tal forma é referida como cápsula (Hsu et al., 2011; Brisse et al., 2013; Piperaki et al., 2017). Quase todos os membros da ordem *Enterobacteriales* são capazes de produzir cápsula e esta propriedade tem sido fortemente associada a infecções extra-intestinais, tais como meningite, septicemia e infecções do trato urinário (Sahly et al., 2008).

Figura 06: Estrutura bacteriana.



Fonte: PodschunAndUllmann, 1998

Legenda: A seta indica a cápsula polissacarídica presente em *Klebsiella pneumoniae*.

A *Klebsiella pneumoniae* frequentemente produz CPS e lipopolissacarídeo (LPS, ou antígeno O), sendo ambos importantes fatores de virulência. A grande maioria dos isolados de *K. pneumoniae* expressa grande quantidade de CPS que cobre toda a superfície da bactéria, resultando em um fenótipo mucóide característico quando cultivadas em placas de ágar (Hsu et al., 2011; Brisse et al., 2013; Piperaki et al., 2017). A CPS é um dos mecanismos de virulência mais importante e essencial para colonização do trato urinário pela espécie *K. pneumoniae* (Campos et al., 2004; Regué et al., 2004; Hsu et al., 2011; Brisse et al., 2013; Piperaki et al., 2017).

A CPS desempenha um papel crítico na proteção de isolados de *K. pneumoniae* contra mecanismos de defesa do hospedeiro, principalmente, quando estas bactérias estão presentes no sangue, já que a cápsula faz com que essas bactérias consigam escapar da

fagocitose e de substâncias bactericidas presentes no soro (Williams et al., 1983; Podschun et al., 1992; Domenico et al., 1994; Schembri et al., 2005; Sahly et al., 2008). A CPS inibe a ativação ou absorção dos componentes do sistema complemento principalmente C3b, inibem também a diferenciação e a capacidade funcional dos macrófagos *in vitro* (Podschun et al., 1992).

Os antígenos capsulares (K) podem ser classificados em 77 sorotipos. Dentre estes, quatro sorotipos (K1, K2, K4 e K5) são considerados mais virulentos. Atualmente, os sorotipos com antígeno capsular K1 e K2 são predominantemente detectadas entre os isolados clínicos humanos (Podschun; Ullmann, 1998). Estudos têm mostrado que o sorotipo capsular parece não influenciar na resistência à fagocitose, mas sim a quantidade de CPS expressa (Pan et al., 2008; March et al., 2013).

A CPS impede a expressão de  $\beta$ -defensinas das células epiteliais respiratórias (Moranta et al., 2010), neutraliza atividade de peptídeos antimicrobianos (Llobet et al., 2008). Além disso, sugere-se que por dificultar a ligação e internalização da bactéria, a CPS induz uma resposta imunológica defeituosa, inclusive a maturação das células dendríticas e a produção de citocinas pró-inflamatórias Th1 (Evrard et al., 2010). Alguns estudos verificaram que a presença de antibióticos como polimixina, ceftazidima e ciprofloxacina podem estimular a produção de CPS (Held et al., 1995; Campos et al., 2004).

As bactérias encapsuladas escapam da fagocitose, pois a natureza química da cápsula parece impedir que as células fagocíticas se fixem à bactéria (Hsu et al., 2011; Brisse et al., 2013; Piperaki et al., 2017). Assim a perda da CPS pode resultar na perda do poder de evasão da fagocitose e em alguns casos da patogenicidade da bactéria. A CPS possui receptores específicos que servem como sítios de ligação à outras superfícies, favorecendo a formação de biofilmes aderidos à diferentes superfícies, assim como um aumento do poder infectante de alguns tipos de bactérias. Por serem formadas por macromoléculas muito hidratadas, servem como proteção contra dessecação do meio, podendo também constituir fonte de nutrientes (Hsu et al., 2011; Brisse et al., 2013; Piperaki et al., 2017). Para a *Escherichia coli* uropatogênica, a CPS parece ser essencial para formação de biofilme (Goller; Seed, 2010). Sendo assim, a cápsula bacteriana tem diversas funções: protege a célula da desidratação e de materiais tóxicos do ambiente (íons de metais, radicais livres) e promove a concentração de nutrientes na superfície da célula bacteriana devido a sua natureza polianiónica. Além disso, a cápsula também pode contribuir para aderência das bactérias às células e a superfícies mucosas. Essa aderência

é necessária para muitos microrganismos para o estabelecimento de infecções em hospedeiros apropriados (Hsu et al., 2011; Brisse et al., 2013; Piperaki et al., 2017).

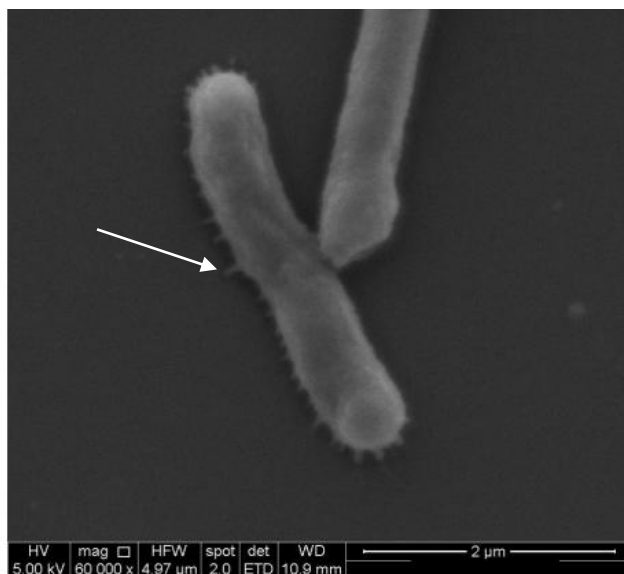
### **HIPERMUCOVISCOSIDADE**

Algumas estirpes de *K. pneumoniae* possuem colônia mucoide de consistência viscosa. Isso pode ser atribuído a presença da proteína RmpA, que é codificada por um gene plasmidial denominado *rmpA* que controla positivamente a síntese do polissacarídeo capsular (Hsuet al., 2011; Jung et al., 2013). Isolados do sorotipo K1 apresentam uma proteína específica a esse sorotipo denominada de MagA, codificada pelo gene *magA*, que confere um fenótipo de hipermucoviscosidade em isolados de *K. pneumoniae* invasivas (Figura 05) (Hunt et al., 2011).

### **FÍMBRIAS**

As fímbrias são estruturas similares aos flagelos, mas sem qualquer envolvimento na motilidade, sendo consideravelmente mais curtas, medindo de 3 a 25 nm de diâmetro e de 10 a 20 µm de comprimento, e mais numerosas que os flagelos (Figura 07). Elas funcionam como organelas celulares para fixação às células e/ou superfícies mucosas; sendo frequentemente denominadas adesinas (Figura 05) (Koneman et al., 2002). Fortes evidências sugerem que as fímbrias conferem capacidade de adesão microbiana às superfícies, incluindo tecidos animais no caso de algumas bactérias patogênicas ou a formação de películas ou biofilmes em superfícies abióticas (Struve et al., 2009; Brisse et al., 2009). A adesão microbiana aos tecidos hospedeiros é uma etapa extremamente necessária ao desenvolvimento da infecção (Tortora et al., 2012; Struve et al., 2009). Nesta etapa as adesinas fimbriais se unem especificamente à receptores moleculares na superfície das células, facilitando a aderência aos tecidos específicos do hospedeiro. As adesinas podem estar localizadas no glicocálice do microrganismo ou em outras estruturas como pili, fímbrias e flagelos (Klemm; Schembri, 2000).

Figura 07- Fímbrias visualizadas por microscopia eletrônica de varredura em isolados de *Klebsiella pneumoniae*



Fonte: Martins et al., 2014

Legenda: a seta indica a fimbria em *Klebsiellapneumoniae*

Já se sabe que a fixação das bactérias aos cateteres é iniciada por adesinas, como as fímbrias, presentes na superfície bacteriana contribuindo para formação de biofilmes nestes dispositivos (Jacobsen et al., 2008). Muitas adesinas apresentam ligação do tipo lectina à resíduos de carboidratos terminais, como por exemplo à manose. A aderência de bactérias entéricas à superfícies mucosas, que é mediada por fímbria tipo 1, pode ser inibida com a pré-incubação das bactérias com manose, onde está liga-se a porção terminal da adesina, bloqueando sua aderência; por essa razão as fímbrias do tipo 1 são referidas como sensíveis a manose (Koneman et al., 2002; Brisse et al., 2009). *K. pneumoniae* produz, principalmente, dois tipos de fímbrias, as do tipo 1 e do tipo 3 (Brisse et al., 2009). São estruturalmente e mecanicamente diferentes, estando essas diferenças atreladas provavelmente as funções que desempenham (Chen et al., 2011). Essas fímbrias são constituídas, principalmente, por monômeros de estrutura principal proteica, com massa molecular média de 20 kDa e subunidades de adesinas, sendo as estruturas monoméricas principais *FimA* e *mrkA* nas fímbrias do tipo 1 e 3, respectivamente, e as subunidades de adesina principais *fimH* ou *mrkD*, podendo ser codificados por genes cromossômicos e plasmidiais (Witkowska et al., 2005; Brisse et al., 2009).

As fímbrias do tipo 1 são manose-específicas, expressas em muitas espécies de enterobactérias, enquanto que as do tipo 3 são específicas para o colágeno IV e V, e encontram-se presentes na maioria dos isolados de *Klebsiella* (Figura 05) (Witkowska et

al., 2005; Brisse et al., 2009). Outros gêneros, além de *Klebsiella*, também expressam fímbrias do tipo 3 como *Providencia*, *Proteus*, *Enterobactere Serratia* (Struve et al., 2009). As fímbrias do tipo 1, que são presentes em *Klebsiella* tem sido mais extensivamente estudada em *Escherichia coli*, mas sabe-se que as estruturas fimbriais do tipo 1 em *K. pneumoniae* são homólogas às de *E. coli* em relação à composição da regulação gênica (Witkowska et al., 2005; Struve et al., 2009). As fímbrias do tipo 1 são finas, rígidas, bastante comuns em espécies da família Enterobacteriales, expressas por diversas espécies desempenhando um papel importante na patogênese bacteriana (Klemm; Schembri, 2000; Sahly et al., 2008; Brisse et al., 2009).

As fímbrias do tipo 1 exercem as suas propriedades adesivas em virtude da adesina *fimH*, um componente menor localizado na ponta da fímbria. A adesina *fimH* reconhece manose contendo glicoproteínas que estão presentes em muitos tecidos do hospedeiro mamífero, tais como a superfície do aparelho urinário. Isto permite que as bactérias se fixem e eventualmente colonizem o uroepitélio (Mulvey, 1998). Dessa forma, as fímbrias do tipo 1 desempenham um papel importante na infecção do trato urinário (ITU) causadas por *E. coli* e *K. pneumoniae* (Sahly et al., 2008). Além disso, as fímbrias do tipo 1 promovem a adesão e invasão bacteriana e também a formação de biofilmes, as quais são características intimamente associadas com a virulência bacteriana (Schembri et al., 2005). Ambas as fímbrias do tipo 1 e 3 estão expressas na formação do biofilme. No entanto, segundo alguns autores, as fímbrias do tipo 3 contribuem fortemente para formação de biofilmes (Schembri et al., 2005; Struve et al., 2009), já as do tipo 1 não (Schroll et al., 2010). As fímbrias do tipo 3 medem 2-4 nm de largura e 0,5-2 µm de comprimento, predominantemente compostas por uma proteína de subunidade grande MrkA, além da adesina MrkD (Allen et al., 1991). Estas fímbrias do tipo 3 pertencem à classe das fímbrias “usherchaperone” codificadas pelo *cluster* gênico Mrk, o qual inclui o gene MrkA que codifica a subunidade principal fimbrial e o MrkD codifica a adesinafimbrial responsável pela aglutinação de eritrócitos pelo mecanismo manose resistente (Struve et al., 2009).

As fímbrias do tipo 3 são capazes de mediar a ligação de *Klebsiella* spp. À diversas células humanas, tais como as endoteliais e epiteliais do trato respiratório e urinário (Ornick et al., 1995; Tarkkanen et al., 1997; Sahly et al., 2008b; Struve et al., 2009). Esse tipo de fímbria pode mediar a ligação ao tecido alvo utilizando a adesina *MrkD* que está associado com a proteína fimbrial MrkA. A formação de biofilmes *in vitro* por isolados de *K. pneumoniae* foi influenciada pela produção de fímbrias na superfície bacteriana,



facilitando a formação do biofilme. No entanto, a proteína MrkD parece não ser necessária para uma rápida e eficiente formação de biofilme, embora seja requerida para adesão às proteínas da matriz extracelular. O principal componente estrutural da fímbria do tipo 3 (MrkA) é uma proteína hidrofóbica, e sua hidrofobicidade pode facilitar as interações bacterianas que conduzem à um crescimento eficiente como biofilme (Brisse et al., 2009). O gene *mrkD* demonstrou mediar a adesão às estruturas de colágeno (Struve et al., 2009).

As fímbrias do tipo 3 parecem desempenhar duas funções importantes para a bactéria, a de promover a interação com receptores específicos das células e tecidos do hospedeiro e a de facilitar o crescimento da bactéria como biofilme (Langstraat et al., 2001). A CPS e as fímbrias são proeminentes componentes estruturais da superfície celular de *K. pneumoniae* e desempenham papéis importantes na sua sobrevivência e patogenicidade. No entanto, alguns estudos relatam a interferência da CPS em outros mecanismos de virulência como as fímbrias e formação de biofilmes. Isolados encapsulados apresentam uma menor quantidade de adesinas, podendo ser a CPS responsável por uma inibição parcial da adesão a células epiteliais, já que as mesmas parecem interagir de alguma forma nos estágios finais da montagem fimbrial, interferindo na biossíntese da adesina (Favre-Bonteet et al., 1999). Esta relação também foi verificada por outros autores, em que os isolados encapsulados aderiram mal à células epiteliais e apresentaram menor poder de invasão (Sahly et al., 2000), indicando que a função das fímbrias pode ser prejudicada devido à presença da CPS. Adicionalmente, foi demonstrado que a CPS interfere, mas não anula o funcionamento das fímbrias, pois não afeta a quantidade de fímbria produzida. A presença da CPS parece impedir que a fímbria tipo 1 inicie a formação do biofilme, já que a inibição da síntese da cápsula melhora o funcionamento desta fímbria (Schembri et al., 2005).

No entanto, há relatos conflitantes na literatura quanto a expressão simultânea de CPS e fímbrias por *K. pneumoniae*, onde numa investigação preliminar, foi relatado que de 32 isolados encapsulados de *K. pneumoniae* provenientes de ITU, 29 foram capazes de expressar fímbria do tipo 1 (Tarkkanen et al., 1992). Por outro lado, Matatov et al. (1999) identificaram uma relação inversa entre cápsula e a expressão de um tipo de fímbria. Eles examinaram um painel de isolados de *K. pneumoniae* derivados de sepses e de ITU e mostraram que os isolados de sepsis encapsulados não produziram as fímbrias de tipo 1, enquanto que a maioria dos isolados de ITU que expressavam as fímbrias do

tipo 1 não eram encapsulados. Esses dados indicam que os isolados encapsulados são incapazes de expressar fímbrias funcionais (Brisse et al., 2009).

### **SISTEMA DE CAPTAÇÃO DE FERRO**

O crescimento de um dado microrganismo no tecido de seu hospedeiro é limitado pelo sistema imunológico do mesmo e pela quantidade de ferro disponível ao microrganismo (Brisse et al., 2009). Em ambientes anaeróbios, o íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) é prevalente, e o mesmo é importado para entrar nas células bacterianas pelas porinas e por sistemas de transporte do tipo ABC. Entretanto em condições aeróbicas, o ferro é encontrado na forma de íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e a sua entrada na célula requer sistemas específicos para a entrada do mesmo (Russo et al., 2011). No hospedeiro, o ferro livre disponível, fator indispensável ao crescimento bacteriano, é baixo, pois geralmente encontra-se ligados a proteínas intracelulares como a hemoglobina, ferritina ou ligadas a proteínas extracelulares como a lactoferrina e transferrina (Podschun; Ullmann, 1998). Para garantir o suprimento de ferro necessário, algumas bactérias secretam substâncias quelantes, denominadas de sideróforos, que solubilizam o ferro e auxiliam na importação deste ferro livre para a região citoplasmática do microrganismo (Brisse et al., 2009). Os sideróforos apresentam uma afinidade 10 vezes maior aos íons férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ) quando comparada as transferrinas ou lactoferrinas (Stuchi et al., 2012). O ferro desempenha papel crucial na regulação de alguns fatores de virulência, entre eles a produção de biofilme.

### **2.3.2 MECANISMO DE RESISTÊNCIA**

Apesar da existência de diversos mecanismos de ação dos antimicrobianos, os microrganismos podem desenvolver sofisticados mecanismos de resistência contra os antibióticos. Os principais mecanismos de resistência relatados até a data são pela exportação do antibiótico (bomba de efluxo); limitação do acesso intracelular da droga através da membrana externa, pela impermeabilidade aos antimicrobianos associada à perda de proteínas de membrana; degradação dos antibióticos pela produção de enzimas hidrolizadoras da droga, como a produção de beta-lactamases e carbapenemases; e proteção dos alvos da droga, como por meio da alteração nas *penicillin binding proteins* (PBPs) (Davin-Regli, et al; 2008; Masi, et al; 2017).

A alteração do sítio alvo onde atua determinado antimicrobiano, de modo a impedir a ocorrência de qualquer efeito inibitório ou bactericida, constitui um dos mais

importantes mecanismos de resistência. As bactérias podem adquirir um gene que codifica um novo produto resistente ao antibiótico, substituindo o alvo original. Alternativamente, um gene recém-adquirido pode atuar para modificar um alvo, tornando-o menos vulnerável a determinado antimicrobiano. Assim, um gene transportado por plasmídeo ou por transposon codifica uma enzima que inativa os alvos ou altera a ligação dos antimicrobianos, como ocorre com a eritromicina e a clindamicina (Munita; Arias, 2016; ANVISA, 2017).

Outro mecanismo de resistência muito frequente em bactérias Gram negativas é a perda de porinas, que são proteínas que formam canais de difusão inespecífica, que naturalmente permitem a passagem para o espaço periplasmático e, em seguida, para o interior da célula, de moléculas de nutrientes. São geralmente pequenas e hidrofílicas, e muitas vezes permitem a passagem dos antibióticos (Nikaido; Vaara; 1985). A perda ou a diminuição dessas proteínas faz com que menos antimicrobiano penetre na célula bacteriana que, conseqüentemente, se torna resistente (Nikaido et al., 2003). A permeabilidade limitada por perda de porinas é responsável pela resistência intrínseca dos Gram negativos à penicilina, eritromicina, clindamicina e vancomicina (Nikaido; Vaara; 1985; Nikaido et al., 2003).

Resistência mediada por bomba de efluxo tem sido encontrada em várias bactérias multidroga-resistentes (MDR) (Nikaido et al., 2009). Nesse mecanismo há uma superexpressão de um sistema de efluxo, responsável pela redução no acúmulo de antibióticos no meio intracelular, por meio de proteínas específicas para a exportação de substâncias nocivas ao metabolismo celular, sendo um mecanismo eficiente para a resistência a drogas (Nikaido et al., 2009; Masi, et al; 2017). O transporte de genes que codifica este mecanismo de resistência pode ser realizado tanto por elementos genéticos móveis como por genes cromossômicos e, podem ser responsáveis pela expressão de resistência adquirida ou intrínseca (Coyne, et al; 2011).

Em bactérias Gram negativas, o sistema de efluxo tipicamente possui três componentes: uma bomba de efluxo, situada na membrana interna ou citoplasmática; uma proteína formadora do canal extrusor na membrana externa (OMP—outermembraneprotein) e uma proteína de fusão (MFP—membranefusion protein) que liga estes dois componentes (Masi, et al; 2017). Esse sistema possui um amplo espectro, expulsando da célula bacteriana substratos como antimicrobianos, anti-sépticos e desinfetantes, desempenhando um importante papel na resistência intrínseca e adquirida de vários patógenos Gram negativos (Coyne, et al; 2011; Masi, et al; 2017).

Outro mecanismo de resistência é a produção de enzimas que neutralizam a droga ou seus efeitos antimicrobianos. Essas enzimas podem ser de natureza constitutiva, quando produzidas independentemente da presença do antibiótico, ou de natureza induzível, produzida quando determinados antibióticos entram em contato com a bactéria, desencadeando ou estimulando a produção da enzima que a protegerão dos efeitos dos antibióticos (Munita; Arias, 2016).

Apesar da possibilidade de atuação dos diversos mecanismos de resistência, a produção de enzimas inativadoras, como as beta-lactamases, vem se mostrando o principal mecanismo de resistência aos antimicrobianos (Oliveira; Silva, 2008; Munita; Arias, 2016). O grau de resistência irá depender da quantidade de enzima produzida, da habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano em questão (potência) e da velocidade com que o beta-lactâmico penetra pela membrana externa da bactéria (permeabilidade da membrana) (Alves, et al; 2004; Munita; Arias, 2016).

### **2.3.2.1 RESISTÊNCIA AOS BETA-LACTÂMICOS**

Os organismos produtores das beta-lactamases apresentam resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. Isso se deve a similaridade estrutural entre esta enzima e o alvo dos beta-lactâmicos, as PBPs, o que permite a ligação e hidrólise do anel beta-lactâmico, impossibilitando a sua atividade antimicrobiana, sendo esta a causa mais frequente de resistência bacteriana a esse grupo de antibióticos (Livermore; Brown, 2001; Babic, Hujer; Bonomo, 2006; Munita; Arias, 2016).

Outra forma de resistência aos beta-lactâmicos é a alteração do sítio alvo do antimicrobiano. Desta forma, o antimicrobiano não pode efetivar a ligação e realizar sua atividade. Estas alterações diminuem a afinidade do antibiótico pelo sítio alvo e ocasionam perda da atividade antimicrobiana. Após a exposição aos antibióticos beta-lactâmicos, as bactérias podem sofrer alterações em suas PBPs de membrana, impedindo a ligação do antibiótico, que degradam a parede celular, evitando a morte bacteriana (Munita; Arias, 2016).

Além da resistência mediada por enzimas e pela alteração de sítio alvo, outra forma de resistência aos beta-lactâmicos é a ausência ou expressão diminuída de proteínas de membrana externa (OMP) em bactérias Gram negativas. A perda de OMPs restringe a entrada de certos beta-lactâmicos no espaço periplasmático dessas bactérias e, portanto, o acesso as PBPs da membrana interna (Livermore; Brown, 2001; Munita; Arias, 2016).

## BETA-LACTAMASES

As beta-lactamases são uma família relativamente complexa de enzimas as quais apresentam grande diversidade de acordo com seus substratos de ação no antibiótico, origem genética (cromossômica ou plasmidial), bem como, sua sensibilidade a compostos inibidores destas enzimas como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e ácido clavulânico (Chaubey, et al; 2010; Bush et al., 2010; Shaikh et al; 2014).

A produção de beta-lactamases é o mecanismo de resistência mais importante em bactérias Gram negativas. Os genes que codificam beta-lactamases podem estar localizados no cromossomo bacteriano, em plasmídios, ou em transposons. O ambiente genético do gene *bla* mostra se estas enzimas são produzidas constitutivamente ou são induzidas. Além disso, um número crescente de genes de *bla* está sendo identificado em integrons (Weldhagen et al., 2004; Bush et al., 2010; Shaikh et al.; 2014).

A produção de beta-lactamases é o mecanismo de resistência mais importante em bactérias Gram negativas. Já foram descritas mais de 400 beta-lactamases foram relatadas (BABIC et al., 2006; MÜNCH et al., 2011).

Os genes que codificam beta-lactamases podem estar localizados no cromossomo bacteriano, em plasmídios, ou em transposons. O ambiente genético do gene de uma beta-lactamase (*bla*) mostra se estas enzimas são produzidas constitutivamente ou são induzidas. Além disso, um número crescente de genes de *bla* está sendo identificado em integrons (BABIC et al., 2006; WELDHAGEN, 2004).

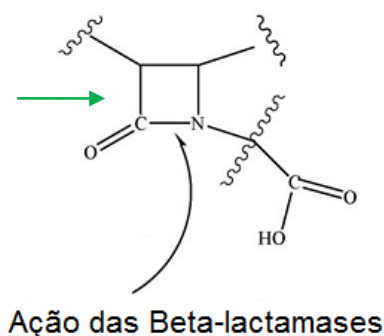
A classificação das beta-lactamases de Bush & Jacoby (2010), organizam estas enzimas, em quatro grandes grupos, de acordo com suas preferências por substratos e conforme o seu perfil de inibição (clavulanato e EDTA). Alguns tipos específicos de beta-lactamases são mais comuns entre as *Enterobacteriaceae*. Entre elas destacam-se as beta-lactamases do Grupo 1 (AmpC) que são enzimas induzíveis, não inibidas por EDTA e ácido clavulânico (BUSH; JACOBY, 2010). Outro grupo de enzimas importantes inclui as beta-lactamases do Grupo 2b (TEM-1, TEM-2 e SHV-1), que são enzimas com um amplo espectro de ação contra antibióticos de últimas gerações. Essas beta-lactamases não são induzíveis e são inibidas por ácido clavulânico (BUSH; JACOBY, 2010; HUOVINEN; JACOBY, 1991; OUELLETTE et al., 1987).

A classificação de Ambler é baseada na sequência gênica das enzimas, definindo 4 classes moleculares designadas como A, B, C e D (AMBLER et al., 1991; HUOVINEN et al., 1998; JAURIN; GRUNDSTRO, 1981). As enzimas A, C e D são serina beta-lactamases, usam cataliticamente os resíduos de serina para inativar os beta-lactâmicos,

por hidrólise do anel beta-lactâmico (LAMOTTE-BRASSEUR et al., 1994). As beta-lactamases de classe B são metaloenzimas, ou seja, utilizam zinco como co-fator para quebrar o anel beta-lactâmico.

Existe uma boa correlação entre a classificação fenotípica citada por Bush em 2010 e a classificação molecular proposta por Ambler em 1991 (figura 08) (MÜNCH et al., 2011; ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Figura 08: Sítio de ação das enzimas beta-lactamases.



Legenda: A seta verde indica o anel beta-lactâmico.  
Fonte: BABIC, 2006.

### 2.3.2.2 RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS

Os antibióticos carbapenêmicos são bastante estáveis à ação das beta-lactamases AmpC e das beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). Entretanto, existe um grupo diverso de beta-lactamases que atuam sobre os carbapenêmicos, as carbapenemases (Bush et al., 2010; Walsh, et al; 2011). A resistência a carbapenêmicos em enterobactérias foi relatada em todo o mundo e isso se deve, principalmente, a aquisição de genes plasmidiais que codificam as enzimas carbapenemases (Queenan; Bush; 2007; Bush et al., 2010).

Os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos em membros da ordem Enterobacteriales incluem diminuição dos níveis de captação destes beta-lactâmicos pela perda ou diminuição da expressão de porinas, ocorrência de expressão de beta-lactamases, como as carbapenemases, além da expressão de bomba de efluxo, que contribuem para a expulsão do antibiótico da região intracelular (Lee, et al; 2010; Munita; Arias, 2016).

## CARBAPENEMASES

As carbapenemases são conhecidas como a classe mais versátil de beta-lactamases, devido ao seu vasto espectro de hidrólise de beta-lactâmicos e de inibidores de beta-lactamase (Nordmann; Poirel, 2002; Queenan; Bush, 2007; Meletis, 2015).

A enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) é a serino-carbapenemase de maior importância médica. O primeiro relato dessa enzima foi, em 1996 no leste dos Estados Unidos em um isolado de *Klebsiella pneumoniae* que portava o gene *bla*<sub>KPC-1</sub> (Yigit et al.; 2001). Tempos depois foi identificada a variante KPC-2 descrita em *K. pneumoniae* (Moland et al.; 2003). Posteriormente o ressequenciamento da KPC-1 indicou que *bla*<sub>KPC-1</sub> e *bla*<sub>KPC-2</sub> são idênticas (Yigit et al.; 2008). Mutações do gene da enzima KPC-2 têm resultado em novas variantes KPC e até o momento, trinta e duas variantes diferentes de KPC (*bla*<sub>KPC-2</sub> a *bla*<sub>KPC-33</sub>) têm sido identificadas, diferenciadas por uma ou duas substituições de aminoácidos (Banes et al.; 2017). Os *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>KPC-3</sub> são as variantes mais comuns identificadas em Enterobacteriaceae, depois de alguns anos da descoberta do *bla*<sub>KPC-2</sub>, ele se espalhou pelo mundo e causou surtos em muitos países asiáticos, norte-americanos e países europeus, bem como na África. Os produtores de KPC evoluíram para ser um β-lactâmico multirresistentes, limitando assim as opções terapêuticas para o tratamento de infecções em pacientes relacionadas com a KPC (Codjoe; Doncor, 2017).

O nível de resistência dos produtores de KPC aos carbapenêmicos pode variar acentuadamente, no entanto, o ertapenem é o carbapenêmico que possui menor atividade antimicrobiana (Nordmann et al; 2009; Navon-Venezia et al; 2009). Produtores de KPC são geralmente multirresistentes e as opções terapêuticas para o tratamento de infecções por KPC continuam limitadas, por isso, as taxas de mortalidade atribuídas a infecções por produtores de KPC são altas (Codjoe; Doncor, 2017).

O surgimento da KPC e a ocorrência em vários microrganismos limitam severamente as opções terapêuticas, resultando no uso de combinações de agentes antimicrobianos na tentativa de obter sinergismo entre os fármacos que sozinhos seriam ineficazes. Outra alternativa é retomar o uso de antibióticos antigos, como a polimixina. No entanto, a terapia antimicrobiana adequada para o tratamento de infecções causadas por microrganismos produtores de KPC continua incerta (Hirsch; Tam, 2010). Estratégias para prevenção e terapia incluem medidas de controle de infecções e modificações no uso de antimicrobianos. A co-resistência com outros antimicrobianos, como os aminoglicosídeos, limita ainda mais as opções terapêuticas indicando a necessidade do

desenvolvimento de novos e mais potentes agentes antimicrobianos com novos mecanismos de ação (Hirsch; Tam, 2010; ANVISA, 2017; CLSI, 2018).



### **3. JUSTIFICATIVA**

As infecções bacterianas constituem uma das principais causas de mortalidade em pacientes críticos, internados nas unidades hospitalares. O aumento da incidência e o aparecimento de mecanismos de virulência, por parte dos microrganismos, tem sido relacionado ao incremento da resistência desses microrganismos aos antibióticos de largo espectro, o que representa um grande risco à saúde dos pacientes hospitalizados. Sabe-se que o desfecho clínico de um paciente está relacionado com sua condição imunológica no momento do contato com o patógeno e com os possíveis fatores de virulência que esse patógeno apresenta. É relevante identificar esses fatores para a compreensão do processo infeccioso do microrganismo, bem como marcadores genéticos nos pacientes infectados que favorecem a susceptibilidade do hospedeiro aos processos infecciosos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Identificar a presença de polimorfismos nos genes que estão mais frequentemente relacionados com a susceptibilidade dos pacientes a desenvolverem infecções bacterianas, bem como relacioná-los a fatores de virulência presentes nos patógenos;

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar a frequência dos genótipos da região promotora dos genes TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 e IL10 em pacientes hospitalizados com infecção no sangue;
2. Verificar se existe associação entre os polimorfismos dos genes TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 e IL10 e o risco ao desenvolvimento de infecção por bactérias virulentas;
3. Caracterizar geneticamente os isolados bacterianos obtidos de hemocultura de pacientes hospitalizados com suspeita de infecção, quanto aos mecanismos de resistência e virulência exibidos;
4. Investigar quais fatores de virulência estão contribuindo para a resistência bacteriana dos isolados que infectam os pacientes;
5. Investigar a relação entre os polimorfismos dos genes TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 e IL10 com os fatores de virulência bacteriano.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 TIPO DE ESTUDO**

Este trabalho consiste em um estudo epidemiológico observacional, do tipo analítico-transversal.

### **5.2 ASPECTOS ÉTICOS**

Os aspectos éticos estão de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, onde foram respeitados os princípios bioéticos. O projeto foi submetido à Plataforma Brasil, para a apreciação do Comitê de Ética do Complexo Hospitalar Oswaldo Cruz/ PROCAPE, sendo aprovado – (CAAE 53611616.1.0000.5192). Todos os pacientes ou responsáveis, de ambos os segmentos, foram orientados sobre a proposta de estudo e foram informados de todos os critérios para a inclusão no projeto e armazenamento das amostras biológicas para possíveis pesquisas futuras, além disso, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ApêndiceA. Apenas após o consentimento do paciente ou responsável, a coleta foi realizada e o material foi armazenado.

### **5.3 LOCAL DO ESTUDO**

O estudo foi realizado no Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), localizado na cidade do Recife em Pernambuco-PE. Nos Laboratórios de Biologia Molecular do Centro de Oncohematologia Pediátrica e no Laboratório de Resistência Bacteriana.

### **5.4. POPULAÇÃO DO ESTUDO**

O grupo estudado trata-se uma amostra de conveniência, coletada no período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018, composto de 100 pacientes de 0 a 28 anos de idades e de ambos os sexos, encaminhados sobre demanda espontânea para investigação clínica e laboratorial para a presença de infecção bacteriana na corrente sanguínea, atendidos no laboratório de bacteriologia do HUOC-UPE com suspeita de sepse e encaminhados para realização do teste de hemocultura. Para os controles do estudo, foram utilizadas 200 amostras de pacientes de 0 a 28 anos de idades e de ambos os sexos, que apresentarem

resultado negativo para hemocultura. A pesquisa não acarreta risco adicional ao paciente, além do empregado no momento da realização do exame, uma vez que não foram necessárias novas coletas de material biológico.

#### **5.4.1 Critérios de Inclusão**

Os pacientes incluídos foram de todas as idades, inclusive recém-nascidos (RN) internados em qualquer setor do Hospital Universitário Oswaldo Cruz com mais de uma hemocultura positiva para a mesma espécie bacteriana, coletadas com pelo menos 6 horas de diferença, e pacientes que não utilizem drogas imunossupressoras.

#### **5.4.2 Critérios de Exclusão**

Foram excluídos pacientes de todas as idades, inclusive recém-nascidos (RN) internados em qualquer setor do Hospital Universitário Oswaldo Cruz com apenas uma hemocultura positiva, pacientes que utilizem drogas imunossupressoras ou apresentem HIV.

#### **5.4.3 Coleta de Dados**

Os dados clínicos e biológicos foram coletados através de consulta ao prontuário dos pacientes e dos livros de registro do setor da Bacteriologia. A princípio, as variáveis analisadas foram: espécie bacteriana isolada e antibioticoterapia. Estas variáveis foram registradas utilizando o software “Excel” para cadastro. As amostras de sangue e os isolados bacterianos foram obtidas a partir da demanda espontânea para investigação clínica e laboratorial da presença de infecção bacteriana na corrente sanguínea.

#### **5.4.4 Coleta de Material Biológico - HUMANO**

A coleta do material biológico humano (sangue periférico) foi diretamente dos tubos de hemocultura, previamente solicitados pelos médicos dos diversos setores do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), a fim de se evitar uma nova coleta invasiva ao paciente. Esses tubos de hemocultura (BACT/ALERT®FA Plus) apresentam 30mL de uma solução contendo: TSB (Caldo Soja Tripticaseína) enriquecido com peptona, BHI (Brain Heart Infusion), carvão ativado e sangue ou SBF (Soro Bovino Fetal) em sua composição e são capazes de mudar de coloração em culturas positivas, por causa das alterações de pH devido ao aumento do CO<sub>2</sub>, que é produzido por microrganismos. Nesse meio de cultura são adicionados 10mL do sangue do paciente somando um volume

final de 40mL de meio de cultura/sangue, que são armazenados por 72 horas a 36,5° C em estufa bacteriológica para serem analisados.

O DNA utilizado nas análises moleculares foi extraído segundo o método proposto por Fredricks e Relmanem 1998, utilizando Cloridrato de Guanidina 5M, que usa o sague direto dos tubos de hemocultura. O material obtido foi armazenado em freezer a -20°C até as análises.

#### **5.4.5 Coleta de Material Biológico - BACTERIANO**

A coleta do material biológico bacteriano foi a partir dos resultados obtidos nas análises das culturas em placas de Petri das hemoculturas, no Laboratório de Bacteriologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), previamente solicitados pelo médico dos diversos setores do HUOC. Foram coletadas colônias puras e isoladas em meio de cultura sólida nos diversos tipos de meio (Teague, MacConkey e Cromogenico). As bactérias isoladas foram identificadas utilizando técnicas automatizadas (Vitek II- Biomerierux) e a confirmação dos mecanismos de resistência foi realizada através de testes fenotípicos (Teste de Hodge modificado e Teste de ESBL em placa) e moleculares (PCR convencional). Esse material foi mantido em criconservação em freezer -80°C, em uma solução V/V de caldo Mueller Hinton e glicerol a 30%, no Laboratório de Resistência Microbiana até o uso.

O DNA bacteriano foi obtido utilizando o reagente BRAZOL<sup>®</sup> e seguindo orientações do fabricante, o material extraído foi armazenado em freezer -20°C até o uso.

##### **5.4.5.1 Testes de Susceptibilidade aos Antimicrobianos**

A determinação da susceptibilidade aos principais grupos de agentes antimicrobianos considerados para cada espécie foi realizada pelo método de automatizado em equipamento VITEK 2 Compact (BioMerieux), seguindo os critérios do BrCast 2018. Foram testados os antibióticos: amicacina, ampicilina, cefalotina, cefoxitima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima, aztreonam, ciprofloxacina, ertapenem, gentamicina, imipenem, meropenem, piperacilina/tazobactam, tigeciclina e colistina (Tabela 01). Para Gram positivos, foram testados penicilina, oxacilina, eritromicina, gentamicina, linezolida, teicoplanina, vancomicina, clindamicina, ciprofloxacina, moxifloxacina e sulfa/trimetoprim (Tabela 02).

Tabela 01: Concentração inibitória mínima dos antimicrobianos para Enterobacterias

<b>Classe</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Sigla</b>	<b>Concentração (µg/ml)</b>
Penicilina	Ampicilina	AMP	≥32
Combinação de β-lactâmicos	Piperacilina/tazobactam	PPT	≥128/4
	Ampicilina/Sulbactam	APS	≥32/16
	Cefepima	CEF	≥16
	Ceftriaxona	CEFT	≥4
Cefalosporinas I, II, III e IV	Cefoxitina	CFO	≥32
	Ceftazidima,	CZD	≥16
	Cefotaxima	CTX	≥
	Cefuroxima	CFU	≥32
Monobactâmico	Aztreonam	AZT	≥16
	Ertapenem	ERT	≥2
Carbapenêmicos	Imipenem	IMI	≥4
	Meropenem	MER	≥4
Quinolona	Ciprofloxacina	CIP	≥4
Aminoglicosídeo	Gentamicina	GEN	≥16
	Amicacina	AMI	≥64
Tetraciclina	Tigeciclina	TIG	≥16

Fonte: BrCast 2018

Tabela 02: Concentração inibitória mínima dos antimicrobianos para Gram positivos

<b>Classe</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Sigla</b>	<b>Concentração (µg/ml)</b>
Fluoroquinolona	Ciprofloxacina	CIP	≥4
	Moxifloxacina	MOX	≥2
Aminoglicosídeo	Gentamicina	GEN	≥16
Penicilina	Oxacilina	OXA	≥0.5
	Penicilina	PEN	≥0.25

	Eritromicina	ERI	≥4
Lincosamida	Clindamicina	CLI	≥4
Oxazolidinona	Linezolida,	LIN	≥8
Glicopeptideo	Teicoplanina,	TEI	≥32
	Vancomicina	VAN	≥16
Antagonista do folato	Sulfa/Trimetroprim	SULT	≥4/76

Fonte: BrCast 2018

#### 5.4.5.2. Determinação da Sequência-Tipo dos Isolados (ST)

A definição do perfil alélico e a determinação da sequência tipo (ST) dos isolados de *K. pneumoniae* foram realizadas através da análise de fragmentos internos de genes de expressão constitutiva como descrito por protocolos do Instituto Pasteur, disponíveis em (<http://www.pasteur.fr/mlst>), pela técnica de MLST (MultiLocusSequenceTyping). Os genes que foram analisados para todos os isolados de *K. pneumoniae* são: *rpoB*, *mdh*, *phoE*, *infB*, *tonB*, *gapA* e *pgi* (Tabela 03). Os experimentos foram realizados através de PCR com primers e condições específicas e foram utilizados 100ng de DNA em cada tubo de reação. O produto obtido na PCR foi sequenciado e posteriormente, as sequências nucleotídicas foram submetidas à análise comparativa no banco de dados do Institute Pasteur (Diancourt et al. 2005).

Tabela 03 - Genes de expressão constitutiva de *K. pneumoniae*

MLST			
Primers	Alvo	Alelos Depositados	Condições
Inf B	Fator 2 de Início de Tradução	84	
Ton B	Transdutor de Energia Periplasmática	226	1 ciclo de 10
Pho E	Fosfoporina E	178	min a 94°C; 30
Pgi	Fosfoglucoisomerase	107	ciclos de 1 min
Gap A	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase	91	a 92°C, 1 min a 50°C, 30 seg a
Mdh	Malato Desidrogenase	117	72°C; 1 ciclo
Rpo B	Beta-Subunidades da RNA-polimerase	88	de 5 min a 72°C

## 5.5 DETERMINAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS

A identificação de polimorfismos do gene TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 e IL10 foram realizadas pela técnica de PCR-RFLP, utilizando *primers* e condições específicas para cada gene (Tabela 04).

Tabela 04: Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos genes humano

<i>Primers</i>	Sequência de Nucleotídeos (5' 3')	Fragmento pb	Alvo	Condições PCR	Referência
TNF $\alpha$ -F	AGG CAA TAG GTT TTG AGG GC	143	TNF $\alpha$	1 ciclo de 3 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 93°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 5 min a 72°C	Cabrera et al., 1995
TNF $\alpha$ -R	TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG				
IL1-F	GTTTAGGAATCTTCCCCTT	305	IL-1 $\beta$	1 ciclo de 1 min a 95°C; 35 ciclos de 1 MIN a 95°C, 30 seg a 56°C, 1 min a 72°C; 1min, 7 min a 72°C	Hurme and Santtila, 1998
IL1-R	TGGCATTGATCTGGTTCATC				
IL6-F	TTG TCA AGA CAT GCC AAA GTG	289	IL-6	1 ciclo de 2 min a 94°C; 30 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 52°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Lima Júnior et al., 2016
IL6-R	TCA GAC ATC TCC AGT CCT ATA				
IL10 G	CCT ATC CCT ACT TCC CCT	285	IL-10 (1082)	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 5 min a 72°C; 1 ciclo de 8 min a 72°C	Hladnik et al. 2002
IL10 A	CTT CTT CCA CCC CAT CT	206			
IL10 GENÉRICO	CCT ATC CCT ACT TCC CCC	490			

### DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO TNF $\alpha$ -308G/A

A genotipagem foi realizada pelo métodoPCR-RFLP. As reações de amplificação foram realizadas como descrito a seguir.

Quadro 01: PCR do TNF $\alpha$

<i>TNF<math>\alpha</math> -308G/A</i>			
Material	Volume	Sequência do primer	Referência
DNA (50 - 150 ng/ $\mu$ l)	1,5uL		
NucleaseFreeWater	5uL		
Master Mix® (2X) (Promega®)	4 $\mu$ L		
<i>Primer</i> Forward(10pMol/uL)	0,5uL	5' - AGGCAATAGGTTTITGAGGGCCAT - 3'	Cabrera et al., 1995



<i>PrimerReverse</i> (10pMol/uL)	0,5uL	5' - TCCTCCCTGCTCCGATTCCG - 3'	Cabrera et al., 1995
<b>TOTAL</b>	<b>14uL</b>		

As reações foram realizadas no termo ciclador Mastercycler Gradient (*Veriti*<sup>®</sup>) com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial do DNA por 3 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos compostos de desnaturação do DNA a 93°C por 1 minuto, pareamento de primer a 55°C por 1 minuto e uma fase de extensão do DNA por 1 minuto a 72°C. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos. A amplificação gerou produto com 107pb, o qual foi submetido ao RFLP.

A digestão enzimática foi realizada de acordo com o seguinte protocolo.

Quadro 02: Digestão enzimática do *TNF $\alpha$*

Material	Volume	Condições da digestão
H <sub>2</sub> Odd	2,7uL	Incubação overnight à 37°C.
Tampão 10X	1uL	
BSA ( <i>BovineSerumAlbumin</i> ) 100 $\mu$ g/ml	0,2uL	
EnzimaNcoI <sup>®</sup> <i>New England Biolabs</i> (10.000 U/mL) (C↓CATG↑G	0,1uL	
Produto amplificado	6uL	
<b>TOTAL</b>	<b>10uL</b>	
<b>Observação:</b> Isosquizômeros de NcoI: Bsp 19I		

O produto da digestão foi aplicado em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio a 10mg/mL, e submetido a uma corrente elétrica de 200 Volts, 400mÅ, por 30 minutos, seguida de visualização em transiluminador de luz ultravioleta (Ultralum) e fotografia do gel com câmera digital.

A genotipagem foi realizada como descrito a seguir.

Quadro 03: Genótipos do *TNF $\alpha$*

	Alelo	Fragmentos esperados
Sem digestão		107pb
Com digestão	TNF GG	20pb + 87pb
	TNF AA	107pb
	TNF GA	107pb +87pb + 20pb

## DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO *IL1β* -511C/T

A genotipagem foi realizada pelo método PCR-RFLP. As reações de amplificação foram realizadas como descrito a seguir.

Quadro 04: PCR do *IL1β*

<i>IL1β</i> (-511) C/T			
Material	Volume	Sequência do primer	Referência
DNA (50 - 150 ng/μl)	3,0uL		
NucleaseFreeWater	2,5uL		
Master Mix® (2X) (Promega®)	6,25μL		
<i>Primer Forward</i> (10pMol/uL)	1,0uL	5' - GTTTAGGAATCTTCCCACTT - 3'	Hurme and Santtila, 1998
<i>Primer Reverse</i> (10pMol/uL)	1,0uL	5' - TGGCATTGATCTGGTTCATC - 3'	Hurme and Santtila, 1998
<b>TOTAL</b>	<b>13,75uL</b>		

As reações foram realizadas no termociclador *Veriti thermocycle* com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial do DNA por 5 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos compostos de desnaturação do DNA a 95°C por 1 minuto, pareamento de primer a 56°C por 1 minuto e uma fase de extensão do DNA por 1 minuto a 72°C. A extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos. A amplificação gerou produto com 305pb, o qual foi submetido ao RFLP.

A digestão enzimática foi realizada de acordo com o seguinte protocolo.

Quadro 05: Digestão enzimática do *IL1β*

Material	Volume	Condições da digestão
H <sub>2</sub> Odd	2,7uL	Incubação overnight à 37°C.
Tampão 10X	1uL	
BSA ( <i>Bovine Serum Albumin</i> ) 100 μg/ml	0,2uL	
Enzima <b>AvaI</b> (Eco88I) 5'... <b>C↓Y C G R G</b> ...3' 3'... <b>G R G C Y↑C</b> ...5'	0,1uL	
Produto amplificado	6uL	
<b>TOTAL</b>	<b>10uL</b>	
<b>Observação:</b> Isosquizômeros de <b>AvaI</b> : Ama87I, AvaI, BmeT110I, BsiHKCI, BsoBIm)		

O produto da digestão foi aplicado em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio a 10mg/mL, e submetido a uma corrente elétrica de 200 Volts, 400mA, por 30 minutos, seguida de visualização em transiluminador de luz ultravioleta (Ultralum) e fotografia do gel com câmera digital.

A genotipagem foi realizada da seguinte maneira.

Quadro 06: Genótipos da *IL1β*

	<b>Alelo</b>	<b>Fragmentos esperados</b>
Sem digestão		305pb
Com digestão	IL1β CC	190pb + 115pb
	IL1β TT	305pb
	ILβ TC	305pb+190pb + 115pb

#### DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO *IL6* -174G/C

A genotipagem foi realizada pela PCR-RFLP. Os pares de sequências dos primers utilizados para as ampliações e as respectivas referências estão descritos na Tabela 04.

Quadro 07: PCR de *IL6*

<i>IL6</i> (-174) G/C			
<b>Material</b>	<b>Volume</b>	<b>Sequência do primer</b>	<b>Referência</b>
DNA (50 - 150 ng/μl)	3,0uL		
NucleaseFreeWater	2,5uL		
Master Mix® (2X) (Promega®)	6,25μL		
<i>Primer Forward</i> (10pMol/uL)	1,0uL	5' - TTG TCA AGA CAT GCC AAA GTG- 3'	Lima Júnior et al., 2016
<i>Primer Reverse</i> (10pMol/uL)	1,0uL	5' - TCA GAC ATC TCC AGT CCT ATA - 3'	Lima Júnior et al., 2016
<b>TOTAL</b>	<b>13,75uL</b>		

As reações de ampliações tiveram volume final de 10 μl, contendo 1 μl de DNA molde (50-100 ng/μl), 0,5μl de primer forward (*IDT*®) (10pmoles), 0,5 μl de primer reverse (*IDT*®) (10pmoles), 4 μl de água livre de nuclease (*Promega*®) e 4 μl de GoTaq® Green Master Mix, 2X (*Promega*®). A reação foi realizada no termociclador Mastercycler Gradient(*Veritij*®) com as seguintes condições de ciclagem: 94 °C por 2 minutos para desnaturação inicial do DNA, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 20 segundos para desnaturação do DNA, 58°C por 30 segundos para pareamento do primer,

e 72 °C durante 30 segundos para extensão do DNA. Após o término dos 35 ciclos, a amplificação foi finalizada com uma extensão a 72°C durante 2 minutos.

Os produtos de PCR de 289pb foram analisados através de eletroforese em gel de agarose à 2% e tampão TBE 1X, corado com brometo de etídeo (5 µg ml<sup>-1</sup>). Após a aplicação das amostras no gel, este foi submetido a uma corrente elétrica de 200 Volts, 400 mA, por 30 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em transluminador-UV e fotografado com câmera digital.

Para a etapa de digestão enzimática, foram utilizados 5 µl do amplificado, 2µl de tampão 10X *Buffer G* (ThermoScientific®), 0,1 µl da enzima Nla III (5 u/µl) (ThermoScientific®) e 2,9µl de água livre de nuclease (*Promega*®), totalizando 10 µl da reação. A reação foi incubada a 37°C por 4 horas. Os produtos da digestão foram analisados através de eletroforese em gel de agarose à 4% e tampão TBE 1X, corado com brometo de etídeo (5 µg ml). Após a aplicação das amostras no gel, este foi submetido a uma corrente elétrica de 200 Volts, 400 mA, por 45 minutos. Os produtos da digestão enzimática foram visualizados em transluminador-UV e fotografado com câmera digital.

Quadro 08: Digestão enzimática do IL6

Material	Volume	Condições da digestão
H <sub>2</sub> Odd	2,7uL	Incubação overnight à 37°C.
Tampão 10X	1uL	
BSA ( <i>BovineSerumAlbumin</i> ) 100 µg/ml	0,2uL	
Enzima HINI	0,1uL	
Produto amplificado	6uL	
<b>TOTAL</b>	<b>10uL</b>	
<b>Observação:</b> Isosquizômeros de HINI: HSP92II, NlaIII		

Após o processo de digestão enzimática, a genotipagem é feita da seguinte forma.

Quadro 09: Genótipos do IL6

	Alelo	Fragmentos esperados
Sem digestão		289pb
Com digestão	IL6 GG	233pb + 56pb
	IL6 CC	123pb+56pb
	IL6 GC	233pb+123pb + 111pb+56pb+12pb

## DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE *IL10* -1082G/A (haplótipo ACC)

A amplificação foi realizada pelo método PCR-ASA - Alelo Específico. As reações de amplificação foram realizadas da seguinte maneira:

Quadro 10: PCR da *IL10*

HAPLÓTIPO - IL10-1082A			
Material	Volume	Sequência do primer	Referência
DNA (50 - 150 ng/μl)	2,0uL		
NucleaseFreeWater	2,25uL		
Master Mix® (2X) (Promega®)	6,5uL		
<i>Primer</i> -1082 Forward(10pMol/uL)	1,5uL	5'-AGCAACACTCCTCGTCGCAAC-3'	Cavet et al., 1999
<i>Primer</i> -1082A (10pMol/uL)	1,5uL	5'-CCTATCCCTACTTCCCCCT-3'	
<i>Primer</i> -1082G (10pMol/uL)	1,5uL	5'-CCTATCCCTACTTCCCCC-3'	
<i>CYP46</i> Primer Reverse (10pMol/uL)	1,5uL	5'-TAG AAA CGA GTT TCC CTG CC-3'	Hladniket al. 2002
<i>CYP46</i> Primer Foward(10pMol/uL)	1,5uL	5'GTG TGA CCA GGT AAC AGT CA -3'	Hladniket al. 2002
<b>TOTAL</b>	<b>16,75uL</b>		

As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler Gradient (*Veriti*®) com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial do DNA por 5 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos compostos de desnaturação do DNA a 94°C por 1 minuto, pareamento de primer a 60°C por 1 minuto e uma fase de extensão do DNA por 1 minuto a 72°C. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos.

As amplificações geraram produtos com 139pb para o gene *IL10* e 285pb para o gene *CYP46*, as quais foram aplicadas em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio a 0,5μL, e submetido a uma corrente elétrica de 200 Volts, 400mÅ, por 20 minutos, seguida de visualização em transluminador de luz ultravioleta (Ultralum) e fotografia do gel com câmera digital.

Quadro 11: Genótipos da *IL10*

Alelo	<i>CYP46</i>	<i>Primer G</i>	<i>Primer A</i>
IL10GG	285pb	139pb	-
IL10AA	285pb	-	139pb
IL10GA	285pb	139pb	139pb

### 5.5.1. Análise Estatística

As diferenças das frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos entre os grupos de pacientes e controles foram comparadas utilizando o teste *G de Williams* em um nível de significância de 5%. O cálculo da *Odds ratio* (OR) com intervalos de confiança de 95% (IC) foi utilizado para verificar a associação entre as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos procurando determinar se os mesmos estão envolvidos no risco de desenvolvimento infecção bacteriana. O *Trend test* (Cochran-Armitage) foi utilizado como modelo adicional para fortalecer hipóteses de associações. As associações foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ . O teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para verificar se as frequências genótípicas observadas, ajustadas com seu esperado, estavam de acordo com a hipótese do equilíbrio de Hardy-Weinberg. As variáveis quantitativas e qualitativas foram analisadas utilizando o teste *t-student*. Na análise de todos os dados foi utilizado o programa BioEstat 5.0.

Os cálculos de sobrevida foram analisados utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0* através da análise de Kaplan-Meier e o teste de Log Rank (Mantel-Cox), para avaliar a significância entre as curvas de sobrevida.

## 5.6 ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES BACTERIANOS

Para a identificação molecular dos principais genes bacterianos realizada a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando primers específicos.

As reações foram preparadas para um volume final de 25 $\mu$ L contendo 1U de Taq Polimerase (FERMENTAS), Tampão da Taq Polimerase 1X (FERMENTAS), 20 $\mu$ M de dNTP (FERMENTAS), 2mM de MgCl<sub>2</sub> (PROMEGA), 0,4 $\mu$ M de cada primer (INVITROGEN) e 20ng ou 100ng do DNA bacteriano. O termociclador utilizado para os experimentos é o My GENETM Series Gradient Thermal Cycler da LongGene®.

### 5.6.1 Virulência Bacteriana

Os diferentes genes de virulência foram investigados ao longo do estudo por PCRs convencional. A detecção dos antígenos capsulares mais prevalentes em isolados nosocomiais, K1 e K2. As fímbrias do tipo 1 e 3, foram investigadas através da amplificação dos genes codificadores da porção funcional de ambas as fímbrias (*fimH* - fímbria do tipo I, *mrkD* - fímbria do tipo 3). A investigação dos genes *rmpA* e *magA*,

relacionados com o fenotípico de mucoviscosidade, *kfu*, relacionado com o sistema de captação de ferro (sideróforo), *wabG*, relacionado com a biossíntese do LPS (Lipopolissacarídeo) e *uge*, relacionado com síntese de UDP galacturonato 4-epimerase, foi realizada utilizando iniciadores contidos na Tabela 05.

Tabela 05: Oligonucleotídeo iniciadores para investigação dos genes de virulência

Primer	Sequência de Nucleotídeos (5' → 3')	Gene	Função	Fragmento (pb)	Referência
K1 – F	GGTGCTCTTTACATCATTGC	<i>magA</i>	Sorotipo Capsular	1283	Fang et al., 2004
K1 – R	GCAATGGCCATTTGCGTTAG				
mrkD-1	TATYGKCTTAATGGCGCTGG	<i>mrkD</i>	Fímbria Tipo III	900	Brisse et al., 2009
mrkD-2	TAATCGTACGTCAGGTTAAAGAYC				
KfuBC – F	GAAGTGACGCTGTTTCTGGC	<i>kfu</i>	Sideróforo	800	Ma et al., 2005
KfuBC – R	TTTCGTGTGGCCAGTGA CTC				
fimH – F	GCTCTGGCCGATAC YACSACGG	<i>fimH</i>	Fímbria Tipo I	400	Brisse et al., 2009
fimH – R	GCRWARTAACGYGCCTGGAAC				
K2_F	GACCCGATATTCATACTTGACAGAG	<i>Wxy</i>	Sorotipo Capsular	641	Turton et al., 2008
K2_R	CCTGAAGTAAAATCGTAAATAGATGGC				
wabG – F	ACCATCGGCCATTTGATAGA	<i>wabG</i>	Síntese de LPS	600	Izquierdo et al., 2003
wabG – R	CGGACTGGCAGATCCATATC				
uge – F	GATCATCCGGTCTCCCTGTA	<i>Uge</i>	Síntese de UDP galacturonato 4-epimerase	500	Regue et al., 2003
uge – R	TCTTCACGCCTTCCTTCACT				
rmpA – F	AGTTAACGTGACTACCTCTGTTTC	<i>rmpA</i>	Hiper mucoviscosidase	535	Hsu et al., 2011
rmpA – R	TACTTGGCATGAGCCATCTTT				

### 5.6.2 Extração e Quantificação de Cápsula Polissacarídica (CPS)

O material capsular associado às células foi purificado pelo método de extração com fenol (Westphal; Jann, 1963). Bactérias cultivadas em 5mL de meio LB contidos em um tubo Falcon de 15 mL em agitação orbital (180 rpm) foram coletadas por

centrifugação a 5000 x g, 15 min, 5°C. O pellet celular foi lavado com 1 mL de água destilada e ressuspensão em 500µL de água destilada. Após dois minutos de incubação a 68°C, 500µL de fenol foram adicionados e a incubação continuará por mais 30 min. Após o esfriamento da mistura, 500µL de clorofórmio foram adicionados e a fase aquosa foi recuperada por centrifugação. A CPS foi precipitada por etanol a -20°C e ressuspensa em 1 mL de água destilada. CPS foi quantificada pela determinação da concentração de ácido urônico através do método carbazol modificado, como descrito por Rahn e Whitfield (2003). Todos os experimentos foram feitos em triplicadas técnicas e biológicas.

### 5.6.3 Resistência Bacteriana

A detecção dos genes de resistência nas bactérias produtoras de carbapenemase foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), conforme descrito na Tabela 06. A determinação da presença da carbapenemase KPC foi realizada pela pesquisa do gene *bla<sub>KPC</sub>*. Além disso, foram analisados outros genes de resistência, como os principais genes de ESBL (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX</sub>* e *bla<sub>SHV</sub>*).

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados foram baseados nas regiões conservadas de cada gene, seguindo-se a sequência consenso e toda a ciclagem necessária para a amplificação dos genes, estão descritas na tabela 06.

Tabela 06: Oligonucleotídeo iniciadores para investigação dos genes de resistência

<i>Primers</i>	Sequência de Nucleotídeos (5' 3')	Alvo	Condições PCR	Referência
KPC-F	ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT	Gene <i>bla<sub>KPC</sub></i>	1 ciclo de 5 min a 95°C; 35 ciclos de 1 min a 95°C, 30 s a 58°C, 1 min 30 s a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Bradford et al., 2004
KPC-R	TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC	Gene <i>bla<sub>KPC</sub></i>		
TEM-C	TCG GGG AAA TGT GCG CG	Gene <i>bla<sub>TEM</sub></i>	1 ciclo de 2 min a 94°C; 30 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 52°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Cao et al., 2002
TEM-D	TGC TTA ATC AGT GAG GCA CC	Gene <i>bla<sub>TEM</sub></i>		
CTX-MA-1	SCS ATC TGC AGY ACC AGT AA	Gene <i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	1 ciclo de 2 min a 94°C; 30 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 56°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Cao et al., 2002
CTX-MA-2	CCG CRA TAT GRT TGG TGG TG	Gene <i>bla<sub>CTX-M</sub></i>		



SHV-OS-5	TTA TCT CCC TGT TAG CCA CC	Gene <i>bla<sub>SHV</sub></i>	1 ciclo de 2 min a 94°C; 30 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 53°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	Cao et al., 2002
SHV-OS-6	GAT TTG CTG ATT TGG CTC GG	Gene <i>bla<sub>SHV</sub></i>		

---

#### 5.6.4 Purificação e Sequenciamento dos Produtos de PCR

A purificação dos produtos obtidos a partir das PCRs realizadas ao longo do estudo foram realizadas utilizando kit comercial, de acordo com as normas do fabricante (Promega). Os produtos de amplificação já purificados foram submetidos a sequenciamento, utilizando o sequenciador 3500 GeneticAnalyzer da AppliedBiosystems. As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas no programa BioEdit e comparadas as sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>).

## 6. RESULTADOS

O grupo de estudo consistiu de 100 indivíduos com pelos menos duas amostras de sangue, com intervalos de 6 horas, positivas para a mesma espécie bacteriana. Esse grupo foi formado por 42 indivíduos do sexo feminino com média de idade de 15,16 anos e 58 indivíduos do sexo masculino com média de idade de 15,55 anos, sendo o indivíduo mais novo com apenas 7 dia de vida e o mais velho com 28 anos. A distribuição dos grupos etários foi: 4% lactentes, 8% crianças em idade pré-escolar, 17% em idade escolar, 34% adolescentes e 37% jovens, sendo que 51% desses pacientes eram pediátricos e 49% adultos. Um total de 34 pacientes foi internado na UTI e todos foram submetidos a ventilação mecânica, assim como 43 pacientes estavam internados no setor de oncologia, e todos eles fizeram uso de profilaxia por antibiótico.

Dos 100 pacientes analisados nesse trabalho, 11 deles foram heterozigotos para todos os polimorfismos analisados. Sendo que desses, 74 (CT) foram heterozigotos para apenas IL1 $\beta$  -511, assim com 66 (GC) para IL6 -174, 59 (AG) para IL10 -1082 e 46 (GA) para TNF  $\alpha$  -308, como apresentado na Tabela 07.

Os SNPs IL1 $\beta$  -511 (C/T) e IL6 -174 (G/C) estudados para essa população não apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg, ou seja, nesse caso não se trata de uma população mendeliana, porém para o gene TNF $\alpha$  -308(G/A), as frequências genótípicas e alélicas foram -308GG = 0,33 (35/100); -308GA = 0,48 (46/100); -308AA = 0,17 (19/100); -308G = 0,58; -308A = 0,42, apresentaram equilíbrio de valores esperados pelo modelo de Hardy-Weinberg ( $p = 0,57$ ; Teste qui-quadrado de Pearson). Para o polimorfismo IL10 -1082(G/A), as frequências genótípicas e alélicas foram -1082GG = 0,27 (23/100); -1082GA = 0,48 (59/100); -1082AA = 0,22 (18/100); -1082G = 0,52; -1082A = 0,47, esses SNPs também apresentaram equilíbrio de valores esperados pelo modelo de Hardy-Weinberg ( $p = 0,06$ ; Teste qui-quadrado de Pearson), como apresentado na Tabela 07.

Tabela 07: Distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos genéticos em pacientes com infecção bacteriana e controles.

Genótipo	Pacientes n= 100(%)	Controles n= 200(%)	$p^*$	OR	95% CI	$p^{**}$
<b><i>TNF<math>\alpha</math></i></b>						
GG	35 (35)	69 (34.5)		1	----	-
GA	46 (46)	98 (49)	0.83	0.92	0.54-1.58	0.8839
AA	19 (19)	33 (16.5)		1.13	0.56-2.27	0.8583
GA+AA	65 (65)	131 (65.5)		0.97	0.59-1.61	0.9658
<b><i>IL1<math>\beta</math></i></b>						
CC	14 (14)	46 (23)		1	----	-
CT	74 (74)	129 (64.5)	0.15	1.88	0.97-3.65	0.0825
TT	12 (12)	25 (12.5)		1.57	0.63-3.92	0.4552
CT+TT	86 (86)	154 (77)		1.83	0.95-3.52	0.0922
<b><i>IL6</i></b>						
GG	22 (22)	58 (29)		1	----	-
GC	66 (66)	114 (57)	0.31	1.52	0.85-2.71	0.1937
CC	12 (12)	28 (14)		1.12	0.48-2.60	0.9429
GC+CC	78 (78)	142 (71)		1.44	0.82-2.54	0.2485
<b><i>IL10</i></b>						
GG	23 (23)	73 (36.5)		1	----	-
GA	59 (59)	104 (52)	0.03	0.72	0.36-1.45	0.4654
AA	18 (18)	23 (11.5)		0.40	0.18-0.87	0.0331
GA+AA	77 (77)	127 (63.5)		0.59	0.30-1.15	0.1717

Legenda:  $p^*$ : Teste G Williams; OR: OddsRatio; IC: intervalo de confiança;  $p^{**}$ : OddsRatio.

Nesse estudo foram obtidas 100 cepas bacterianas, sendo (41) *Klebsiella pneumoniae* e várias outras espécies, como: (16) *Staphylococcus* spp.; (12) *Escherichia coli*; (8) *Serratia marcescens*; (7) *Acinetobacter* spp. e *Enterobacter* spp.; (3) *Enterococcus* spp.; (2) *Pseudomonas aeruginosa*; e apenas (1) *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella* spp. e *Rautella ornithinolytica*.

Foi realizada a tipagem molecular de todos os 41 isolados de *Klebsiella pneumoniae*, onde foi identificado que 24,3% deles pertenciam ao ST 11, assim com

14,6% ao ST 512 e ST 442, 9.7% ao ST 258, 7.3% ao ST 340 e ST 1199, 4.8% ao ST 17 e ST 502 e apenas 3.4% pertenciam ao ST 111, ST 196, ST 528, ST 978 e ao ST 1998.

Todas as *K. pneumoniae* foram analisados para os genes de virulência bacteriana, todas foram positivas para *mrkD*, *fimH*, *kfu* e *wabG*, apenas uma das 41 cepas analisadas foi negativa para *uge*, assim como todas as cepas foram negativas para *rmpA* e para os sorotipos capsulares K1 e K2. Também foram analisados genes de resistência bacteriana (7) foram positivas para *bla<sub>KPC</sub>*, (9) para *bla<sub>TEM</sub>*, (41) para *bla<sub>SHV</sub>* (25) para *bla<sub>CTX-M</sub>*, conforme descrito na Tabela 08.

Tabela 08. Genes de resistência, sequência tipo dos isolados de *Klebsiella pneumoniae*

ISOLADOS	GENES DE VIRULÊNCIA <sup>a</sup>						GENES DE RESISTÊNCIA				ST <sup>b</sup>
	<i>fimH</i>	<i>mrkD</i>	<i>kfu</i>	<i>wabG</i>	<i>uge</i>	<i>rmpA</i>	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	<i>bla<sub>CTX-M-like</sub></i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	
Kp1	+	+	+	+	+	-	11	2	-	-	978
Kp2	+	+	+	+	+	-	12	15	-	-	502
Kp3	+	+	+	+	+	-	62	-	-	-	502
Kp4	+	+	+	+	-	-	148	-	-	-	17
Kp5	+	+	+	+	+	-	11	165	-	-	1998
Kp6	+	+	+	+	+	-	11	2	-	-	17
Kp7	+	+	+	+	+	-	11	15	-	-	196
Kp8	+	+	+	+	+	-	85	15	-	-	111
Kp9	+	+	+	+	+	-	11	-	-	-	11
Kp10	+	+	+	+	+	-	11	15	1	2	11
Kp11	+	+	+	+	+	-	11	-	-	-	1199
Kp12	+	+	+	+	+	-	11	15	1	2	11
Kp13	+	+	+	+	+	-	11	2	1	2	442
Kp14	+	+	+	+	+	-	11	5	1B	-	340
Kp15	+	+	+	+	+	-	12	15	-	-	11
Kp16	+	+	+	+	+	-	48	15	-	-	512
Kp17	+	+	+	+	+	-	12	15	-	2	512
Kp18	+	+	+	+	+	-	12	-	-	-	11
Kp19	+	+	+	+	+	-	11	-	1	-	340
Kp20	+	+	+	+	+	-	11	-	-	-	512
Kp21	+	+	+	+	+	-	11	-	-	-	258
Kp22	+	+	+	+	+	-	23	-	-	-	442
Kp23	+	+	+	+	+	-	12	15	1	-	340
Kp24	+	+	+	+	+	-	11	-	-	-	1199
Kp25	+	+	+	+	+	-	11	5	1B	-	258
Kp26	+	+	+	+	+	-	11	2	2	2	442
Kp27	+	+	+	+	+	-	11	2	-	-	258
Kp28	+	+	+	+	+	-	11	5	-	-	512
Kp29	+	+	+	+	+	-	11	15	-	2	11
Kp30	+	+	+	+	+	-	11	-	2	-	442
Kp31	+	+	+	+	+	-	11	-	2	-	258
Kp32	+	+	+	+	+	-	12	-	2	-	512
Kp33	+	+	+	+	+	-	23	15	-	2	11

Kp34	+	+	+	+	+	-	48	15	-	-	442
Kp35	+	+	+	+	+	-	11	2	-	-	528
Kp36	+	+	+	+	+	-	11	-	-	-	11
Kp37	+	+	+	+	+	-	11	5	-	-	1199
Kp38	+	+	+	+	+	-	11	-	-	-	442
Kp39	+	+	+	+	+	-	11	-	-	-	512
Kp40	+	+	+	+	+	-	11	15	-	-	11
Kp41	+	+	+	+	+	-	11	15	-	-	11

Legenda: <sup>a</sup>*fimH* (fimbria tipo I), *mrkD* (fimbria tipo 3), *kfu* (Sistema de captação de ferro), *wabG* (síntese de LPS), *uge*(Síntese de UDP galacturonato 4-epimerase), *rmpA* (hipermucoviscosidade). <sup>b</sup>Sequência Tipo.

O teste de susceptibilidade ao antimicrobianos das *K. pneumoniae* analisadas mostrou que 100% (41/41) delas foram resistentes a amicacina, ampicilina, ampicilina/subactam, cefepima, cefotaxima, cefoxitina, ceftriaxona, cefuroxima e piperacilina/tazobactam. Assim como, 70.7% (29/41) foram resistentes a gentamicina, 63.4% (26/41) a ciprofloxacina, 48.7% (20/41) a tigeciclina e apenas 17% (7/41) foram resistentes aos carbapenêmicos (ertapenem, meropenem e imipenem). Todas as cepas estudadas foram sensíveis a colistina.

Os resultados produzidos no início deste trabalho geraram dados suficientes para a escrita e submissão do artigo intitulado: VIRULENCE AND RESISTANCE IN DISTINCT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* SEQUENCE TYPES CAUSING BLOODSTREAM INFECTIONS IN PAEDIATRIC ONCOLOGICAL PATIENTS(Apêndice B), que foi submetido à revista JOURNAL OF HOSPITAL INFECTION, que tem fator de impacto 3,704, e Qualis é A2 em Biotecnologia e em Ciências Biológicas I.

Além disso, os resultados obtidos nesse trabalho também foram suficientes para a elaboração de um segundo artigo, que tem como título sugerido: IL10 -1082G/A POLYMORPHISM IS ASSOCIATED IN PATIENTS WITH BLOOD BACTERIAL INFECTION (Apêndice C), que foi submetido à revista INFECTION AND IMMUNITY, que tem como fator de impacto 3,2, e Qualis é A2 em Biotecnologia e em Ciências Biológicas I.

## 7. DISCUSSÃO

Nossos achados revelam que homozigotos para o alelo A do polimorfismo *IL10* -1082 G/A apresentam um risco quatro vezes maior de desenvolver infecção bacteriana

em comparação com pacientes heterozigotos. Este achado é consistente com os de Cardoso e colaboradores (2015) e Abu-Maziad e colaboradores (2010), em que bebês com genótipo AA para IL10 tiveram um aumento na incidência de sepse tardia. A IL10 é uma citocina anti-inflamatória que aumenta a gravidade da infecção bacteriana em recém-nascidos (Romagnoli et al. 2001, Ng et al. 2003). Evidência experimental tem mostrado que a IL10 é um candidato terapêutico para choque séptico irreversível (Latifi et al. 2002). Este SNP IL10 -1082 (G/A), está localizado dentro da região promotora da IL10 e presume-se, portanto, que afeta a atividade transcricional do gene. Porque os indivíduos portadores do alelo A diminuíram os níveis circulantes de IL10 (Schaaf et al. 2003), hipotetizamos que os homozigotos AA são propensos a respostas pró-inflamatórias, que favorecem o choque séptico. No entanto, outras avaliações das concentrações circulantes de IL10 e genotipagem de outros polimorfismos da região promotora do gene *IL10*, tais como microssatélites, -819 (C/T) e -592 (C/A) devem ser avaliados para esclarece o papel da IL10 no favorecimento da ocorrência de choque séptico (Cardoso et al 2015).

Dado o significado funcional dos polimorfismos -1082 e -592 e do haplótipo ATA, levantamos a hipótese de que os polimorfismos do promotor de IL10 seriam importantes para influenciar a gravidade para o desenvolvimento de sepse e morbidades em pacientes com infecção, alterando o equilíbrio de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Não houve diferenças significativas na idade e entre os sexos entre os diferentes grupos genotípicos, o que minimizou a influência de fatores interferentes. A coorte de pacientes era composta por pacientes jovens com baixo histórico de comorbidades. Semelhante à sua associação com a produção de IL10, as variações genéticas nos três loci têm tendência a estarem associadas a menor risco de sepse e morbidade. No entanto, apenas o polimorfismo -1082 tem significância estatística, mostrando que os pacientes homozigotos para o alelo A, tinha uma susceptibilidade significativamente maior na sepse. O fato de não haver significancia estatística do genótipo GG com a susceptibilidade em desenvolver infecção bacteriana pode ser devido ao pequeno número de pacientes portadores do genótipo GG no presente estudo. Os resultados de Stanilova e colaboradores (Stanilova et al., 2006) também revelaram que o genótipo AA do locus -1082 foi associado com menor produção de IL10 na presença do LPS, fitohemaglutinina – ou leucócitos do sangue periférico saudáveis. Pacientes com sepse grave demonstraram ter uma elevação significativa da frequência alélica A quando comparados com controles saudáveis. Além disso, Gong e colaboradores (Gong et al., 2006) relataram que o genótipo de alta produção de IL10 -1082 GG protege contra a falência de órgãos e a mortalidade

na síndrome do desconforto respiratório agudo. É cada vez mais reconhecido que o equilíbrio global entre respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é importante no desenvolvimento da sepse. Portanto, é razoável que o genótipo AA IL10 -1082 pode ser usado para estimar o risco para disfunção orgânica e sepse. Por outro lado, isso não é consistente com o relatório de Schroeder e colegas, que mostraram que o polimorfismo -592, mas não -1082, foi associado com morbidade em pacientes com infecção (Schroeder et al., 2004).

Zeng e colaboradores (2009) realizaram uma combinação de resultados que mostram que os pacientes com 2 haplótipos ATA apresentam maiores taxas de morbidade, embora seja significativamente associado com menor produção de IL10. O que sugere que há uma falta de sinergismo entre os polimorfismos -1082, -819 e -592 em relação ao desenvolvimento de sepse em pacientes hospitalizados. Outros fatores patogênicos também devem ser considerados ao explicar os resultados atuais. Um fator importante é o envolvimento poligênico e multifatorial na patogênese da sepse e disfunção de múltiplos órgãos após infecção (Giannoudis et al., 2007). De fato, há evidências crescentes indicando que polimorfismos genéticos de outros genes estão associados a ocorrência de complicações pós-traumáticas, como IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , proteína de choque séico, IFN $\gamma$  e IL18 (Hildebrand et al., 2005; Wen et al., 2006). A suscetibilidade a sepse em pacientes hospitalizados pode ser o resultado de uma combinação de vários polimorfismos genéticos. Além disso, a amostra relativamente pequena que recrutamos neste estudo também pode afetar nossas conclusões.

Apesar das nossas análises não mostrarem significância estatística para o TNF $\alpha$  -308 G/A com o risco de desenvolver infecção bacteriana, Wang e colaboradores, realizaram uma ampla análise do polimorfismo -380 G/A do TNF $\alpha$ , no estudo eles mostra que a presença desse polimorfismo do TNF $\alpha$  contribui significativamente para o risco de sepses e choque séptico, mas não para risco de mortalidade relacionada à sepse. Assim, esse polimorfismo parece ser um fator de risco para sepse, mas não uma mortalidade predita (Wang et al 2017). Segundo alguns pesquisadores o polimorfismo -308 G/A no gene TNF $\alpha$  demonstrou regular positivamente o gene transcrição, levando a níveis mais altos de proteína expressa no soro (Wang et al 2017; Gowin et al 2018). Os níveis de TNF $\alpha$  elevado aumentam a resposta inflamatória e levam a múltiplas características fenotípicas e funcionais da sepse; eles também induzem a apoptose e reduzem a imunidade, responsividade e função celular (Gowin et al 2018).

Nossa amostra, apesar de se tratar de amostra de conveniência, foi considerada adequada e está dentro do padrão de vários estudos de polimorfismo para os genes e população estudados (Warlé et al 2003; Gowin et al 2018). Dentro da nossa população de 100 pacientes, foram estudadas 41 amostras, também, para a presença de genes de virulência bacteriana, no intuito de saber se a presença de gene poderia contribuir para a sucesso na infecção por cepas da espécie *Klebsiella pneumoniae*, uma vez que esses são os organismos mais frequentes em unidade hospitalar causando infecção nos pacientes (Russo et al 2019). As cepas do nosso estudo foram consideradas hipervirulentas, fenótipo semelhante ao descrito por Xu e colaboradores, onde eles descrevem cepas acumulando pelo menos três genes para fatores de virulência distintos, nossas cepas, com exceção do isolado Kp4, que não apresenta o gene *uge*, apresentam pelo menos cinco genes de virulência distintos em sua constituição, o que em conjunto as tornam capazes de serem resistentes ao sistema imunológico do hospedeiro. Esse fenótipo de hipervirulência não é comum em isolados clínicos, uma vez que as cepas bacterianas que carregam muitos mecanismos de resistentes não tem a tendência a acumular também mecanismos de virulência, principalmente porque passam por processos de pressão seletiva distintos (Xu et al 2018; Russo et al 2019). Apenas uma das nossas amostras, a Kp4, não apresentou o gene *uge*, Regué e colaboradores (2004) provaram que as cepas mutantes de *K. pneumoniae* (sem o gene *uge*) não eram virulentas em animais de laboratório, esse fato comprova o importante papel do gene *uge* na patogenicidade de *K. pneumoniae*.

É importante destacar que sete pacientes estudados para a os fatores de virulência bacteriana, além de apresentarem isolados com cinco genes de virulência também eram homocigoto A para IL10 -1082, esse perfil pode facilitar ainda mais a susceptibilidade a infecção bacteriana, uma vez que vários fatores poderiam estar agindo em conjunto e desestabilizando o sistema imunológico desses pacientes, para isso novos estudos se fazem necessários para confirmar a relevância clínica dos polimorfismos do promotor de IL10 em uma coorte maior de pacientes com infecção bacteriana e investigar a relação desses SNPs com outros polimorfismos genéticos na predição de pacientes com infecção bacteriana no sangue e outros fatores de virulência bacteriana.

O gene *fimH* foi encontrado em todos os isolados. Este resultado está de acordo com a natureza frequentemente presente desta estrutura em *K. pneumoniae* como relatado Aljanaby e Alhasani (2016). Microrganismos com formação de biofilme estão associados a muitas infecções humanas. O papel e desenvolvimento da formação de biofilme por bactérias tem sido documentado como um passo crucial na patogênese da *Klebsiella*.



Biofilmes e lipoproteínas da membrana externa podem desempenhar um papel importante na proteção de bactérias contra a exposição a drogas quando comparados com outras bactérias que não apresentam esses fatores de virulência (Bellifa et al., 2013).

Os sideróforos são compostos bio-sinteticamente produzidos e secretados por muitos microrganismos, como fungos e bactérias, para absorção de ferro ( $\text{Fe}^{+3}$ ), e são quelantes seletivos. Esses íons são fracamente solúveis e quase encontrados em todos os ambientes oxigenados. Neste estudo, o gene *kfu* foi encontrado em todos os isolados. Enterobactina e yersiniabactin são compostos de sideróforos produzidos por células bacterianas para absorver ferro ( $\text{Fe}^{+3}$ ) das proteínas de ligação de ferro do hospedeiro, e eles têm quelantes férricos extracelulares de afinidade forte, os quais; eles têm um papel importante na patogênese e virulência das bactérias, a virulência desses compostos permanece incerta; no entanto, a expressão da formação de biofilme induzida pela enterobactina (May;Okabe, 2011). Mas Aljanaby e Alhasani (2016) sugeriram que a expressão do gene da ferro-enterobactina responsável pelo receptor da membrana externa parece ser ativada durante a infecção bacteriana. O gene *kfu* é um gene patogênico putativo que codifica um sistema de absorção de ferro, esse gene está associado às infecções do tecido purulento, formação de cápsulas e fenótipo de hipermucoviscosidade. Portanto, esse gene é considerado como um gene muito importante na retirada do ferro da célula hospedeira (Aher et al., 2012).

Outro fator de virulência estudado foi o gene *wabG* que estava presente em todas as cepas, Izquierdo e colaboradores (2003) provaram que cepas de *K. pneumoniae* com o gene *wabG* mutante não eram capsuladas e eram menos virulentas em modelo animal (ratos) com pneumonia. Este fato comprova o importante papel do gene *wabG* na patogenicidade de *K. pneumoniae*. Também observou-se que o defeito na síntese dos principais lipopolissacarídeos em cepas de *K. pneumoniae* com o gene *wabG* mutante foi incapaz de induzir a infecção do trato urinário em ratos experimentais, em comparação com o das cepas normais. As cepas bacterianas mutantes ainda eram capazes de realizar alguma colonização (Izquierdo et al 2003).

Apenas um dos isolados não apresentou o gene *uge*, Regué e colaboradores (2004) provaram que as cepas mutantes de *K. pneumoniae* (sem o gene *uge*) não eram virulentas em animais de laboratório; esse fato comprova o importante papel do gene *uge* na patogenicidade de *K. pneumoniae*.

As análises dos sorotipos capsulares mostrou que nenhum dos isolados analisados nesse estudo apresentou os sorotipos capsulares K1 e K2, diferente dos relatos em outros

estudos, uma vez que esses sorotipos são frequentes em cepas bacterianas clínicas, independentes no seu sítio de infecção, em um estudo realizado por Xu e colaboradores em 2018, mostrou que K1 e K2 estavam presentes em 24,2% e 7,7%, respectivamente, das cepas analisadas. No entanto sabemos que existe relatos de 79 sorotipos capsulares distintos em *K. pneumoniae* (Pan et al 2015), porém esses não são tão frequentes em cepas clínicas, isso significar uma característica própria da população estudada, frente a uma adaptação a pressão seletiva que estão enfrentando.

Os testes fenotípicos para produção de ESBL foram positivos para 48.7% (20/41). Os genes SHV, CTX-M e TEM foram presente em 100% (41/41), 60.9% (25/41) e 26.8% (11/41), respectivamente. Esses padrões de resistência podem ser devidos à expressão de diferentes enzimas, como Beta-lactamases de espectro estendido. As resistências a múltiplas drogas são frequentemente associadas com bactérias produtoras de Beta-lactamase de espectro estendido, isto é, resistência a outras classes de drogas como aminoglicosídeos e quinolonas (Vargas et al 2019). Padilla e colaboradores em (2010) relataram que mecanismos de resistência, como bomba de efluxo, podem contribuir para a virulência de *Klebsiella pneumoniae*, e houve relação positiva entre a produção de ESBL com fatores de virulência (Wiskur et al., 2008).

Além disso, 17% (7/41) das nossas cepas apresentaram o gene KPC, infecções causadas por organismos produtores de KPC geralmente acometem pacientes imunodeprimidos, hospitalizados e/ou que fazem uso de dispositivos invasivos, como cateter e sonda (Vargas et al 2019).

O ST mais frequente em nosso estudo foi o ST11 que assim com ST340 também localizados em nosso estudo, segundo Pereira e colaboradores 2013, são os mais bem disseminados no Brasil, esses STs já foram descritos em todas as regiões do país e já são considerados endêmicos e muitas vezes então associados com a presença de genes de resistência aos antimicrobianos com genes de ESBL e KPC-2 (Peireira et al 2013). No Brasil, a rápida expansão internacional de clones de *K. pneumoniae* do ST11 com alto nível de resistência aos carbapenêmicos tem sido documentado em todo o mundo, e estão associados com altas taxas de morbidade e mortalidade. Além disso, a presença de cepas pertencentes ao CC258 (ST11, ST258, ST340), foram identificadas em humanos, animais de produção, ambiente aquático urbano e águas recreativas em regiões metropolitanas de grandes cidades do Brasil (Huenuman et al 2018). A identificação de genes de virulência associados a esses STs, causa ainda mais impacto, uma vez que essas cepas têm muita facilidade de adquirir genes de resistência (Araújo, 2019).

As cepas do estudo carregavam pelos menos cinco genes de virulência e estavam mais associadas com STs relacionados a aquisição de genes de resistência, o podem corroborar para um incremento de danos aos hospedeiros. Em um estudo realizado por Cheng e colaboradores em (2018) foi identificado a presença dos genes *wabG* e *rmpA* associados principalmente ao ST218, que já foi descrito em países como Tailândia, Vietnã, Coréia do Sul e Rússia, onde essas cepas estavam associadas com abscesso hepático em humanos (Cheng et al 2018).

Nossos achados revelaram que os polimorfismos IL10 -1082G/A e características clínicas selecionadas podem ser usados como marcadores para o desenvolvimento de infecção bacteriana. Portanto, modelos prognósticos incluindo esses biomarcadores pode permitir a identificação precoce de pacientes com sepse, e impedir o choque séptico, embora outros estudos serão necessários para confirmação desses dados em diferentes populações e com outras espécies bacterianas. Neste contexto, hipotetizamos que a imunossupressão induzida pela IL10 pode produzir um impacto na restrição da infecção do que no desfecho da sepse. Acreditamos que a incorporação de biomarcadoresque possam identificar quais pacientes são mais susceptíveis à infecções e sepse poderá ajudar na estratificação de risco de pacientes e consequentemente melhorar o tratamento e demanda nas UTIs.

## 8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho, mostram que para a população estudada o genótipo AA da IL10 -1082 G/A está associado ao risco de desenvolver infecção bacteriana por cepas virulentas, pois esses dois fatores estavam associados a pacientes com infecção sanguínea. Os outros SNPs estudados, TNF $\alpha$  -308 G/A, IL1 $\beta$  -511 C/T e IL6 -174 G/C, necessitam de uma amostra maior para encontrarmos associação com a infecção bacteriana, pois a população estudada é muito miscigenada, por isso, necessitamos de um coorte maior para se alcançar a frequência esperada para todos os SNPs analisados.

Contudo até o momento não foi possível identificar uma associação estatística entre os SNPs dos genes de imunidade estudados e a susceptibilidade ao desenvolvimento de infecção bacteriana, esses resultados se devem ao número reduzido de amostras

analisadas. Entretanto, certamente os vários genes de virulência carreado por essas bactérias e os alelos mutantes estão contribuindo para o sucesso do processo infeccioso.

Nossos resultados revelam que as cepas clínicas da população estudada são hipervirulentas, apresentando pelos menos cinco genes de virulência distintos, provavelmente adquirido de eventos diferentes, o que não é um achado comum em isolados hospitalares, uma vez que os relatos apontam que cepas hospitalares são mais resistentes e normalmente não apresentam muitos fatores de virulência. Além dos genes de virulência, alguns isolados também apresentaram genes de resistência a cefalosporinas e a carbapenêmicos, o que mostra que essas cepas estão acumulando mecanismos de resistência.

A partir das nossas análises não foi possível identificar quais fatores de virulência especificamente estavam contribuindo para o aumento da resistência bacteriana que infecção os pacientes, uma vez que as nossas cepas apresentaram um perfil muito homogêneo de virulência, mas certamente o genótipo AA da IL10 -1082 G/A está contribuindo, uma vez que ela está relacionada com baixa produção de citocina anti-inflamatória IL10 favorecendo o processo inflamatório desencadeado pelos fatores de virulência bacteriano.

## 9. REFERÊNCIAS

Abraham WT, Iyengar S. Neutral endopeptidase inhibitors and endothelin antagonists: why did the clinical trials not demonstrate beneficial effects?. 2005. Heart Fail Clin. Apr;1(1):95-102. Epub Jan 7.

Abu-Maziad A, Schaa K, Bell EF, Dagle JM, Cooper M, Marazita ML, Murray JC 2010. Role of polymorphic variants as genetic modulators of infection in neonatal sepsis. *Pediatr Res* 68: 323-329.

Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, S Gupta R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. 2016. *Int J Syst Evol Microbiol*. Dec;66(12):5575-5599

ADIB-CONQUY M, CAVAILLON JM. Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS letters*, Amsterdam, v. 581, n. 581, p. 3723-33, Jul. 2007.

Aher T, Roy A, Kumar P (2012). Molecular Detection of Virulence Genes Associated with Pathogenicity of *Klebsiella spp.* isolated from the respiratory tract of apparently healthy as well as sick goats. *Isr. J. Vet. Med.* 67(4):249-52.

Alba J, Ishii Y, Thomson K, Moland ES, Yamaguchi K. Kinetics Study of KPC-3, a Plasmid-Encoded Class A Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase. *Society*. 2005;49(11):4760-2.

Ali, AM.; Al-kakei, SN. Virulence factors genotyping of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Baghdad. *Reviews in Medical Microbiology*, 2019, Volume 30 - Issue 1 - p 36-46.

Aljanaby AAJ, Alhasani AHA. 2016. Virulence factors and antibiotic susceptibility patterns of multidrug resistance *Klebsiella pneumoniae* isolated from different clinical infections. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 10(22), pp. 829-843, 14 June.

Allen A, Obaro S, Bojang K, et al. Variation in Toll-like receptor 4 and susceptibility to group A meningococcal meningitis in Gambian children. *Pediatr Infect Dis J* 1991; 22: 1018–1019.

Alves M, Junior DS, Ferreira S, Carvalho G. um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. 2004;152–74.

ANDERL, J. N.; FRANKLIN, M. J.; STEWART, P. S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobialagentsandchemotherapy*, v. 44, n. 7, p. 1818–24, 2000.

ANVISA. Indicadores Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde Unidade de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos – UIPEA Gerência Geral de Tecnologia em. *anvisa*. 2017;1–17.

ANVISA. Indicadores Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde Unidade de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos – UIPEA Gerência Geral de Tecnologia em. *anvisa*. 2010;1–17.

ANVISA. Orientações para a notificação nacional das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), Resistência Microbiana (RM) e monitoramento do consumo de antimicrobianos – UIPEA Gerência Geral de Tecnologia em. *anvisa*. 2018;1–17.

Araújo M. I. A. S, Machado P. R. L, Carvalho L, Carvalho E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. 2019; 79(6):647-664.

Arman A, Yılmaz B, Coker A, Inanc N, Direskeneli H. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RN) and interleukin-1B gene polymorphisms in Turkish patients with rheumatoid arthritis. 2006. *Clin Exp Rheumatol* 24 (6): 643-8.

Assistat. Statistical Assistance. University Federal of Campina Grande, Paraíba, Brazil, 2017. Available: <http://www.assistat.com/indexi.html>.

Babic M, Hujer AM, Bonomo R a. What’s new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist. Updat.* [Internet]. 2006 Jun [cited 2011 Sep 20];9(3):142–56.

Barber, R. C., Chang, L. Y., Purdue, G. F., Hunt, J. L., Arnoldo, B. D., Aragaki, C. C., & Horton, J. W. 2006. Detecting genetic predisposition for complicated clinical outcomes after burn injury. *Burns*, 32(7).

Beceiro A, Tomás M, Bou G. 2011. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? *Clinical Microbiology Reviews* 2: 185–230.

Beceiro A, Tomás M, Bou G. 2013. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? *Clinical Microbiology Reviews* 2: 185–230.

Bellifa S, Hassaine H, Balestrino D, Charbonnel N, M'hamedi I, Terki IK, Lachachi M, Didi W, Forestier C (2013). Evaluation of biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the University Hospital of Tlemcen, Algeria. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7(49):5558-5564.

Ben-Hamouda T. Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. *J. Med. Microbiol.* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2011 Oct 30];52(5):427–33. Available from: <http://jmm.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/jmm.0.04981-0>

Bradford, P. A 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. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2004. v. 39, n. 1, p. 55-60, 1 jul.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – BrCAST, 2018. <http://brcast.org.br/>

Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C, Decré D. wzi Gene Sequencing, a Rapid Method for Determination of Capsular Type for *Klebsiella* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013 Volume 51 Number 12 p. 4073– 4078.

Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C, Decré D. wzi Gene Sequencing, a Rapid Method for Determination of Capsular Type for *Klebsiella* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009 Volume 51 Number 12 p. 4073– 4078.

BROUWER M C; GANS J; SEBASTIAN; HECKERBERG G B; WINDERMAN H Z; POLL T and BEEK D. Infectious Diseases. The Lancet , v. 9, n. 1, p. 31-44, 2009.

Bush K, Jacoby G a. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. [Internet]. 2010 Mar [cited 2011 Jun 13];54(3):969–76.

Cabrera M, Shaw MA, Sharpies C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM. 1995. Polymorphism in Tumor Necrosis Factor Genes Associated with Mucocutaneous Leishmaniasis. J. Exp. Med 182: 1259-1264.

CAMPOS, M. A.; VARGAS, M. A.; BALEARES, I.; MALLORCA, P. DE. Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides. , v. 72, n.12, p. 7107–7114, 2004

Cannon J G, Tompkins R G, Gelfand J A et al., “Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever,” *Journal of Infectious Diseases*, vol. 161, no. 1, pp. 79–84, 1990.

CAO, V, Loan HK, Hoang NK, Arlet G, and Courvalin P. Distribution of Extended-Spectrum  $\beta$  -Lactamases in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. Antimicrobial agents and chemotherapy, Washington, 2002 v. 46, n. 12, p. 3739-3743. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.3739-3743.2002>

Cardoso CP, Oliveira AJA, Botoni FA, Rezende ICP, Alves-Filho JC, Cunha FQ, Estanislau JASG, Magno LAV, Rios-Santos F. 2015. Interleukin-10 rs2227307 and CXCR2 rs1126579 polymorphisms modulate the predisposition to septic shock. Mem Inst Oswaldo Cruz 1-8.

Chaubey VP, Pitout JD, Dalton B, Ross T, Church DL, Gregson DB, et al. Clinical outcome of empiric antimicrobial therapy of bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. BMC Res. Notes [Internet]. 2010 Jan;3:116.

Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, Ali MM, Mcguire F, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. 2013. Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. *in vivo* 27: 669-684.



CHORLEY, B. N. et al. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: Current and developing technologies. *Mutatin Research*, v. 659, p. 147–157, 2008.

Choy E, “Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis,” *Rheumatology*, vol. 51, supplement 5, pp. v3–v11, 2012.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. 2018.

Conte D, Holcik M, Lefebvre C A et al., “Inhibitor of apoptosis protein cIAP2 is essential for lipopolysaccharide-induced macrophage survival,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 26, no. 2, pp. 699–708, 2006.

Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* [Internet]. 2011 Mar [cited 2011 Jul 13];55(3):947–53.

Davin-Regli A, Bolla JM, James CJ, Lavigne JP, Chevalier J, Garnotel E, et al. Membrane permeability and regulation of drug “influx and efflux” in enterobacterial pathogens. *Current Drug Targets* 2008; 9: 750-9.

DE NARDIN, E. Genetic polymorphisms and immune responses. *Immunological Investigations*, v. 38, p. 198-202, 2009.

DELLINGER, R. P. et al. Campanha de sobrevivência à sepse: Diretrizes internacionais para tratamento de sepse grave e choque séptico: 2012. *Care Med.* V.14, n.2, fev 2013.

Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. *Society.* 2005;43(8):4178–82.

DIAS, M. B. G. S. et al. Diagnóstico e tratamento precoce da sepse grave no adulto. *Hospital SírioLibanês.* jan 2014.

Dinarello C A, “Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed,” *Journal of Endotoxin Research*, vol. 10, no. 4, pp. 201–222, 2004.

Dinarello C A, “Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock,” *Chest*, vol. 112, supplement 6, pp. 321S–329S, 1997.

Dinarello C, Arend W, Sims J et al., “IL-1 family nomenclature,” *Nature Immunology*, vol. 11, no. 11, article 973, 2010.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 519-550, 1997.

DOMENICO, P.; SALO, R. J.; CROSS, A S.; CUNHA, B. A. Polysaccharide capsule mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity*, v. 62, n. 10, p. 4495–9, 1994. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=303135&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 208-218, 2009.

Essack SY, Hall L. MC, Livermore DM (2009). *Klebsiella pneumoniae* isolate from South Africa with multiple *TEM*, *SHV* and *AmpC* beta-lactamases. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 23:398-400.

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), *Clinical Breakpoints Version 4.0*, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2018.

EVRARD, B.; BALESTRINO, D.; DOSGILBERT, A; et al. Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity*, v. 78, n. 1, p. 210–9, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2798207&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

Fahlman C, Jacobsen F W, Veiby O P, McNiece I K, Blomhoff H K, and Jacobsen S E W, “Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) potently enhances in vitro macrophage production from primitive murine hematopoietic progenitor cells in combination with stem cell factor

and interleukin-7: novel stimulatory role of p55 TNF receptors,” *Blood*, vol. 84, no. 5, pp. 1528–1533, 1994.

Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. 2004. A Novel Virulence Gene in *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications. *The Journal of Experimental Medicine*, 2004, Volume 199, Number 5, 697–705.

Farmer III, J.J.; Boatwright, K.D.; Janda, M. Enterobacteriaceae: introduction and identification. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Landry, M.L.; Pfaller, M.A.; *Manual of clinical microbiology*, 9<sup>th</sup> ed. American Society for microbiology: washington, 2007, v. 1, cap. 42, p. 649-669.

Favre-Bonte S, Licht TR, Forestier C, Krogfelt KA. 1999. *Klebsiella pneumoniae* capsule expression is necessary for colonization of large intestines of streptomycin-treated mice. *Infect Immun* 67:6152– 6156.

Fiorentino D F, Zlotnik A, Mosmann T R, Howard M e O’Garra A, “IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages,” *The Journal of Immunology*, vol. 147, no. 11, pp. 3815–3822, 1991.

Fong Y, Tracey K J, Moldawer L L et al., “Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 $\beta$  and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 170, no. 5, pp. 1627–1633, 1989.

FRANK, D. N.; WILSON, S. S.; ST AMAND, A. L.; PACE, N. R. Culture-independent microbiological analysis of foley urinary catheter biofilms. *PloSone*, v. 4, n. 11, p. e7811, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2771765&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

Giannoudis PV, van Griensven M, Tsiridis E, Pape HC. 2007. The genetic predisposition to adverse outcome after trauma. *J Bone Joint Surg Br* 89:1273-1279.

Gogos CA, Drosou E, Bassaris H P e Skoutelis A: Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: A marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 181(1): 176-180, 2000.

GOLLER, C. C.; SEED, P. C. Revisiting the . . . , n. August, p. 333–337, 2010.

Gong MN, Thompson BT, Williams PL, Zhou W, Wang MZ, Pothier L, Christiani DC: Interleukin-10 polymorphism in position - 1082 and acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J* 2006, 27:674-681.

Gong MN, Thompson BT, Williams PL, Zhou W, Wang MZ, Pothier L, Christiani DC. 2006. Interleukin-10 polymorphism in position - 1082 and acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J* 27:674-681.

Gowin E, Świa\_tek-Kos\_cielna B, Kalu\_zna E, et al. Analysis of TLR2, TLR4, TLR9 single nucleotide polymorphisms in children with bacterial meningitis and their healthy family members. *Int J Infect Dis* 2017; 60: 23–28.

Gowin E, Swiatek-Koscielna B, Kałuzna E, Strauss E, Wysocki J, Nowak J, Michalak M, Januszkiewicz-Lewandowska D. 2018. How many single-nucleotide polymorphisms (SNPs) must be tested in order to prove susceptibility to bacterial meningitis in children? Analysis of 11 SNPs in seven genes involved in the immune response and their effect on the susceptibility to bacterial meningitis in children. *Innate Immunity* 24: 163–170.

GREGERSEN, P. K.; OLSSON, L.M. Recent Advances in the Genetics of Autoimmune Disease. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 363-391, 2009.

Hazlett LD, Jiang X, McClellan SA. 2014. IL-10 Function, Regulation, and in Bacterial Keratitis. *JOURNAL OF OCULAR PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS* 30: 373-380.

HELD, T. K.; ADAMCZIK, C.; TRAUTMANN, M.; CROSS, A S. Effects of MICs and sub-MICs of antibiotics on production of capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 39, n. 5, p. 1093–6, 1995. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=162689&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

Hesse D G, Tracey K G, Fong Y et al., “Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia,” *SurgeryGynecology and Obstetrics*, vol. 166, no. 2, pp. 147–153, 1988.

Hessle CC, Andersson B and Wold AE: Gram-positive and Gram-negative bacteria elicit different patterns of pro-inflammatory cytokines in human monocytes. *Cytokine* 30: 311-318, 2005.

Hildebrand F, Pape HC, van Griensven M, Meier S, Hasenkamp S, Krettek C, Stuhmann M: Genetic predisposition for a compromised immune system after multiple trauma. *Shock* 2005, 24:518-522.

Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J. Antimicrob. Chemother.* [Internet]. 2010 Jun [cited 2011 Jul 18];65(6):1119–25.

Holmes CL, Russel JA, Walley KR. 2003. Genetic Polymorphisms in Sepsis and Septic Shock. *CHEST JOURNAL* 124: 1103-1115.

Holub M, Lawrence DA, Andersen N, Davidová A, Beran O, Marešová V, Chalupa P. 2013. Cytokines and Chemokines as Biomarkers of Community-Acquired Bacterial Infection. *Mediators of Inflammation* 2013: 1-7.

HORNER C, SCHUSTER S, PLACHKY J, HOFER S, MARTIN E, WEIGAND MA. Hemofiltration and immune response in severe sepsis. *The Journal of surgical research*, New York, v.142, n.1, p. 59-65, Sep. 2007.

Hsu, CR., Lin, TL., Chen, YC, Chou HC, Wang JT. The role of *Klebsiella pneumoniae* *mpaA* in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. *Microbiology*. 2011, 157, 3446–3457.

HUNT, J. J.; WANG, J. T.; CALLEGAN, M. C. Contribution of mucoviscosity associated gene A (*magA*) to virulence in experimental *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis. *Investigative ophthalmology and visual science*, St. Louis, v. 52, n. 9, p. 6860-6866, Ago 2011.

Izquierdo L, Coderch N, Piqué N, Bedini E, Corsaro MM, Merino S, Fresno S, Tomás JM, Regué M. 2003. The *Klebsiella pneumoniae* *wabG* Gene : Role in Biosynthesis of the Core Lipopolysaccharide and Virulence. *Journal of Bacteriology*, Washington 185: 7213–7221.

Izquierdo, L, Coderch N, Piqué N, Bedini E, Corsaro MM, Merino S, Fresno S, Tomás JM, Regué M. The *Klebsiella pneumoniae* wabG Gene: Role in Biosynthesis of the Core Lipopolysaccharide and Virulence. *Journal of Bacteriology*, Washington, 2003. v. 185, n. 24, p. 7213–7221. <https://doi.org/10.1128/JB.185.24.7213-7221.2003>

Jawien J, “New insights into immunological aspects of atherosclerosis,” *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, vol. 118, no.3, pp. 127–131, 2008.

JONES, R. N. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 51 Suppl 1, p. S81–7, 2010. Disponívelem: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20597676>>.

Jung SW, Chae HJ, Park YJ, Yu JK, Kim SY, Lee HK, Lee JH, Kahng JM, Lee SO, Lee MK, Lim JH, Lee CH, Chang SJ, Ahn JY, Lee JW, Park YG. Microbiological and clinical characteristics of bacteraemia caused by the hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Epidemiology and Infection* 2013, 141:334–340.

Jung SW, Chae HJ, Park YJ, Yu JK, Kim SY, Lee HK, Lee JH, Kahng JM, Lee SO, Lee MK, Lim JH, Lee CH, Chang SJ, Ahn JY, Lee JW, Park YG. Microbiological and clinical characteristics of bacteraemia caused by the hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Epidemiology and Infection* 2013, 141:334–340

Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier J, and Fahmi H, “Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis,” *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 7, no. 1, pp. 33–42, 2011.

Khaertynov KS, Anokhin VA, Rizvanov AA, Davidyuk YN, Semyenova DR, Lubin SA, Skvortsova NN. 2018. Virulence Factors and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated From Neonates With Sepsis *Frontiers in Medicine* 14:1-9.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Fimbrial surface display systems in bacteria: from vaccines to random libraries. *Microbiology (Reading, England)*, v. 146 Pt 12, p.3025–32, 2000. Disponívelem: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11101660>> . .

KUBISTOVA, S.; MRAZEK, F., PETREK, M. Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Republic*, v. 153, p. 93–102, 2009.

Kuhns D B, Alvord W G, and Gallin J I, “Increased circulating cytokines, cytokine antagonists, and E-selectin after intravenous administration of endotoxin in humans,” *Journal of Infectious Diseases*, vol. 171, no. 1, pp. 145–152, 1995.

Latifi S Q, O’Riordan M A, e Levine A D, “Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock,” *Infection and Immunity*, vol. 70, no. 8, pp. 4441–4446, 2002.

LEAVER SK, FINNEY SJ, BURKE-GAFFNEY A, EVANS TW. Sepsis since the discovery of Toll-like receptors: disease concepts and therapeutic opportunities. *Critical Care Medicine*, Philadelphia, v.35, n.5, p.1404-10, May. 2007.

Lee Y, Yum JH, Kim C-K, Yong D, Jeon EH, Jeong SH, et al. Role of OXA-23 and AdeABC efflux pump for acquiring carbapenem resistance in an *Acinetobacter baumannii* strain carrying the blaOXA-66 gene. *Ann. Clin. Lab. Sci.* [Internet]. 2010 Jan;40(1):43–8.

Lima Júnior SF, Tavares MMF, Macedo JL, Oliveira RS, Heráclio SA, Maia MMD, Souza PRE, Moura R, Crovella S. 2016. Influence of IL-6, IL-8, and TGF- $\beta$ 1 gene polymorphisms on the risk of human papillomavirus-infection in women from Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111(11): 663-669.

Liu KT, Liu YHA, Lin CY, Kuo PL, Yen MC. 2016. Inflammatory molecules expression pattern for identifying pathogen species in febrile patient serum. *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE* 12: 312-318.

LIU, Y.; WANG, J.-Y.; JIANG, W. An Increasing Prominent Disease of *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess: Etiology, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology research and practice*, v. 2013, p. 258514, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3806164&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

Livermore DM, Brown DFJ. Detection of  $\beta$ -lactamase-mediated resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001. 48: S59-S64.

LLOBET, E.; TOMÁS, J. M.; BENGOCHEA, J. A. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology (Reading, England)*, v. 154, n. Pt 12, p. 3877–86, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19047754>>.

Ma LC, Fang CT, Lee CZ, Shun CT, Wang JT. 2005. Genomic Heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* Strains Is Associated with Primary Pyogenic Liver Abscess and Metastatic Infection. *The Journal of Infectious Diseases* 192:117–28.

MAGESH, H.; KUMAR, A.; ALAM, A.; et al. Identification of natural compounds which inhibit biofilm formation in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *PubMed Commons. Indian Journal of Experimental Biology (IJEb)*, v. 51, n. 9, p. 764–772, 2013.

Malefyt R D W, Abrams J, Bennett B, Figdor C G, e Vries J E, “Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 174, no. 5, pp. 1209–1220, 1991.

MALLEO G, MAZZON E, SIRIWARDENA AK, CUZZOCREA S. Role of tumor necrosis factor-alpha in acute pancreatitis: from biological basis to clinical evidence. *Shock, Augusta*, v.28, n.2, p.130-40, Aug. 2007.

MARCH, C.; CANO, V.; MORANTA, D.; et al. Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. *PloSone*, v. 8, n. 2, p. e56847, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3574025&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

Martin PL, Cornacoff J, Prabhakar U, Lohr T, Treacy G. 2005. Preclinical Safety and Immune-Modulating Effects of Therapeutic Monoclonal Antibodies to Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in *Cynomolgus* Macaques. *Journal of Immunotoxicology* 1:131–139.



MATATOV, R.; GOLDHAR, J.; SKUTELSKY, E.; et al. Inability of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* to assemble functional type 1 fimbriae on their surface. *FEMS microbiology letters*, v. 179, n. 1, p. 123–30, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10481096>>. .

May T, Okabe S (2011). Enterobactin is required for biofilm development in reduced genome *Escherichia coli*. *Environ. Microbiol.* 13:3149-62.

Mayer-Barber KD, Yan B. 2017. Clash of the Cytokine Titans: counter-regulation of interleukin-1 and type I interferon-mediated inflammatory responses. *Cellular & Molecular Immunology* 14: 22–35.

Mendonca N, Ferreira E (2009). Genetic diversity of genes encoding OKP and LEN  $\beta$ -lactamases produced by clinical *Klebsiella pneumoniae* strains in Portugal. *Diagn. Microbial. Infect. Dis.* 63:334-38.

Mera S, Tatulescu D, Cismaru C, Bondor C, Slavcovici A, Zanc V, Carstina D and Oltean M: Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *APMIS* 119(2): 155-163, 2011.

Mesquita D. J, Araújo J A P, Catelan T. T, Souza A. W. S, Cruvinel W. M, Andrade L. E.C, Silva N. P; Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reumatol* 2010;50(5):552-80.

Michie H R, Manogue K R, Spriggs D R et al., “Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 318, no. 23, pp. 1481–1486, 1988.

Mogensen TH, Paludan SR, Kilian M, et al. Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 267–277.

Moland ES. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* [Internet]. 2003 Jan 28 [cited 2011 Jul 26];51(3):711–4.

Molinaro, Etelcia Moraes, Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 1 / Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira. - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009.

MOORE, R.; O'SHEA, D.; GEOGHEGAN, T.; MALLON, P. W. G.; SHEEHAN, G. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: an emerging infection in Ireland and Europe. *Infection*, v. 41, n. 3, p. 681–6, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23381876>>.

MORANTA, D.; REGUEIRO, V.; MARCH, C.; et al. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of beta-defensins by airway epithelial cells. *Infection and immunity*, v. 78, n. 3, p. 1135–46, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2825953&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinis A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med*. 1993;177:1675-80.

MULLER-STEINHARDT M, EBEL B, HARTEL C. The impact of interleukin-6 promoter -597/-572/-174 genotype on interleukin-6 production after lipopolysaccharide stimulation. *Clinical and Experimental Immunology*, Oxford, v.147, n.2, p.339-45, Feb. 2007.

NAPARSTEK, L.; CARMELI, Y.; NAVON-VENEZIA, S.; BANIN, E. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, p. 1–8, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24408988>>.

Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* [Internet]. 2009 Feb [cited 2011 Sep 4];53(2):818–20.

Ng PC, Li K, Wong RPO, Chui K, Wong E, Li G, Fok TF 2003. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 88: F209-F213.

Nikaido H and Vaara M. *Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability*. American Society for Microbiology 1985. Mar v. 49, n 1, p 1-32.

Nikaido H. *Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited*. Society. 2003;67(4):593–656.

Nikaido H. Multidrug Resistance in Bacteria. *Natl. INSTITUTES Heal.* 2009;(2):119–46.

NIVEDITHA, S.; PRAMODHINI, S.; UMADEVI, S.; KUMAR, S.; STEPHEN, S. The Isolation and the Biofilm Formation of Uropathogens in the Patients with Catheter Associated Urinary Tract Infections (UTIs). *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, v. 6, n. 9, p. 1478–82, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23285434>>.

Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009 Apr [cited 2011 Jul 20];9(4):228–36.

Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* [Internet]. 2002 Jun;8(6):321–31.

O'Hara, C. M. Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and others aerobic gram -negative bacilli. *Clinical Microbiology Reviews* 2005, v. 18, p. 147-162.

O'Neill L A J, "The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress," *Immunological Reviews*, vol. 226, no. 1, pp. 10–18, 2008.

Oliveira AC, Albuquerque CP, Rocha LCM. *Infecções Hospitalares: abordagem, prevenção e controle*. Rio de Janeiro (RJ): Medsi; 2008.

Padilla E, Llobet E, Dome'nech-Sa'nchez A, Marti'nez-Marti'nez L, Bengoechea JA, Alberti' S (2010). *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:177-183.

PAN, Y.-J.; FANG, H.-C.; YANG, H.-C.; et al. Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. *Journal of clinical microbiology*, v. 46, n. 7, p. 2231–40, 2008. Disponívelem: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2446917&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PARHAM P. O Sistema Imune. Porto Alegre : Ed. Artmed, 2001. 372 p.

Pathan N, Hemingway C A, Alizadeh A A et al., “Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock,” *The Lancet*, vol. 363, no. 9404, pp. 203–209, 2004.

Paton, R., RS. Miles, J. Hood, and SGB. Amyes. ARI 1:  $\beta$ -lactamase mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob*, 1993. *Agents* 2:81–87.

Pereira PS, 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) 2012; 15: 1-5.

Perez M J R and Ruiz M J M, “A review: inflammatory process in Alzheimer’s disease, role of cytokines,” *The Scientific World Journal*, vol. 2012, Article ID 756357, 15 pages,2012.

Peterson J. W. (1996). Bacterial Pathogenesis. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. (4th ed., Chapter 7). Disponivelem: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8526/>.

Piperaki ET, Syrogiannopoulos GA, Tzouvelekis LS, Daikos GL. *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2017 Volume 36, Number 10.

PODSCHUN, R.; PENNER, I.; ULLMANN, U. Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes. *Microbial pathogenesis*, v. 13, n. 5, p. 371–9, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1338474>>. .

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp . as Nosocomial Pathogens : Epidemiology , Taxonomy , Typing Methods , and Pathogenicity Factors *Klebsiella* spp . as Nosocomial Pathogens : Epidemiology , Taxonomy , Typing Methods , and Pathogenicity Factors. , v. 11, n. 4, 1998.

Poirel L, He C, Spicq C, Nordmann P. In Vivo Acquisition of High-Level Resistance to Imipenem in *Escherichia coli*. *Society*. 2004;42(8):3831–3.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* [Internet]. 2007 Jul [cited 2011 Jul 19];20(3):440–58.

Rahn A, and Whitfield C. Transcriptional organization and regulation of the *Escherichia coli* K30 group 1 capsule biosynthesis (*cps*) gene cluster. *Molecular Microbiology*, 2003. 47:1045–1060. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03354.x>

Rau M, Schiller M, Krienke S, Heyder P, Lorenz H e Blank N: Clinical manifestations but not cytokine profiles differentiate adult-onset still's disease and sepsis. *J Rheumatol*37(11): 2369- 2376, 2010.

Regué M, Hita B, Pique N, Izquierdo L, Merino S, Fresno S, Benedí VJ, Tomás JM. A Gene, *uge*, Is Essential for *Klebsiella pneumoniae* Virulence. *Infection And Immunity*, 2004, p. 54–61. <https://doi.org/10.1128/iai.72.1.54-61.2004>

Regue, M, Climent NR, Abitiu N, Coderch NR, Merino S, Izquierdo L, Altarriba M, Tomás JM. 2001 Genetic Characterization of the *Klebsiella pneumoniae* *waa* Gene Cluster, Involved in Core Lipopolysaccharide Biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, Washington 183: 3564–3573.

REGUÉ, M.; HITA, B.; PIQUÉ, N.; et al. A Gene ,*uge* , Is Essential for *Klebsiella pneumoniae* Virulence A Gene , *uge* , Is Essential for *Klebsiella pneumoniae* Virulence. ,2003.

Reid CL, Perrey C, Pravica V, Hutchinson IV, Campbell IT. 2003. Genetic variation in proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 30:2216-2221.

Remick D G, Bolgos G, Copeland S, and Siddiqui J, “Role of interleukin-6 in mortality from and physiologic response to sepsis,” *Infection and Immunity*, vol. 73, no. 5, pp. 2751–2757, 2005.

Romagnoli C, Frezza S, Cingolani A, De Luca A, Puopolo M, De Carolis MP, Vento G, Antinori A, Tortorolo G 2001. Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis. *Eur J Pediatr* 160: 345-350.

Russo TA, Marr CM. 2019. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Microbiology Reviews* 32: 1-19.

SAHLY, H.; NAVON-VENEZIA, S.; ROESLER, L.; et al. Extended-spectrum betalactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 52, n. 9, p. 3029–34, 2008a. Disponível: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2533491&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SAHLY, H.; NAVON-VENEZIA, S.; ROESLER, L.; et al. Extended-spectrum betalactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 52, n. 9, p. 3029–34, 2008b. Disponível: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2533491&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SAHLY, H.; PODSCHUN, R.; OELSCHLAEGER, T. A; et al. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity*, v. 68, n. 12, p. 6744–9, 2000. Disponível: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=97775&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>> . .

Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol*. 1991;84:103-8.

SATURNINO SF, ANDRADE MV. Toll-Like Receptors, *New Horizons in Sepsis. Current Molecular Medicine*, v.7, n.5, p. 522-531, 2007.

Schaaf BM, Boehmke F, Esnaashari H, Seitzer U, Kothe H, Maass M, Zabel P, Dalhoff K 2003. Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10-1082 gene promoter polymorphism. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 476-480.

SCHEMBRI, M. A. *et al.* Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae* Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, Washington, v. 73, n. 8, p. 4626-4633, 2005.

SCHLICHTING D, MCCOLLAM JS. Recognizing and managing severe sepsis: a common and deadly threat. *South Medicine Journal*, Cebu City, v.100, n.6, p. 594-600, Jun. 2007.

Schouten M, Wiersinga W J, Levi M, and van der Poll T, “Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis,” *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 83, no. 3, pp. 536–545, 2008.

Schroeder O, Laun RA, Held B, Ekkernkamp A, Schulte KM. 2004. Association of interleukin-10 promoter polymorphism with the incidence of multiple organ dysfunction following major trauma: results of a prospective pilot study. *Shock* 21:306-310.

SCHROLL, C.; BARKEN, K. B.; KROGFELT, K. A; STRUVE, C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC microbiology*, v. 10, p. 179, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2911432&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. 2013. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. *Mediators of Inflammation* 2013: 1-16.

Seitz M, Loetscher P, Dewald B, Towbin H, Gallati H e Baggiolini M, “Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts,” *European Journal of Immunology*, vol. 25, no. 4, pp. 1129–1132, 1995.

SHANKS RM, SARGENT JL, MARTINEZ RM, GRABER ML, O'TOOLE GA. Catheter lock solutions influence staphylococcal biofilm formation on abiotic

surfaces. *Nephrology, Dialysis and Transplantation*, Oxford, v.21, n.8. p. 2247-55, Aug. 2006.

Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. 2013. Hypervirulent hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* A new and dangerous breed. *Landes Bioscience* 4: 107–118.

SILVA, FP; VELASCO, IT. SEPSE. Barueri: Manole, 2007. 512p.

SINGHAI, M.; MALIK, A.; SHAHID, M.; MALIK, M. A.; GOYAL, R. A study on devicerelated infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. *Journal of global infectious diseases*, v. 4, n. 4, p. 193–8, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3543538&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SRISKANDAN S, ALTMANN DM. The immunology of sepsis. *Journal of Pathology*, v. 214, p: 211-223, 2008.

Stanilova S A, Miteva L D, Karakolev Z T e Stefanov C S: Interleukin-10-1082 promoter polymorphism in association with cytokine production and sepsis susceptibility. *Intensive Care Med* 32(2): 260-266, 2006.

Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infection and Immunity* 2009. 77:5016–5024.

Suffredini A F, Fromm R E, Parker M M et al., “The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 321, no.5, pp. 280–287, 1989.

Surbatovic M, Filipovic N, Radakovic S, Stankovic N e Slavkovic Z: Immune cytokine response in combat casualties: Blast or explosive trauma with or without secondary sepsis. *Mil Med* 172(2): 190-195, 2007.

SUTHERLAND AM, WALLEY KR, MANOCHA S, RUSSELL JA. The association of interleukin6haplotypecladeswithmortalityincriticallyilladults. *Archives of Internal Medicine*, Chicago, v. 165, n. 1, p. 75-82, Jan.2005.



Tarkkanen M, Kaipainen A, Karaharju E, Böhling T, Szymanska J, Hellö H, Kivioja A, Elomaa I, Knuutila S (1992): Cytogenetic study of 249 consecutive patients examined for a bone tumor. *Cancer Genet Cytogenet* 68:1-21.

Tarkkanen M, Karhu R, Kallioniemi A, Elomaa I, Kivioja AH, Nevalainen J, Böhling T, Karaharju E, Hyytinen E, Knuutila S, Kallioniemi O-P: Gains and losses of DNA sequences in osteosarcomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1997, 55:1334- 1338.

TEXEREAU J, CHICHE J D, TAYLOR W, CHOUKROUNG, COMBAB, MIRAJ P. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 7, p. S408-15, Nov. 2005.

TISCHENDORF JJ, YAGMUR E, SCHOLTEN D, VIDACEK D, KOCH A, WINOGRAD R, GRESSNER AM, TRAUTWEIN C, WASMUTH HE, LAMMERT F. The interleukin-6 (IL6)-174 G/C promoter genotype is associated with the presence of septic shock and the ex vivo secretion of IL6. *International Journal of Immunogenetics*, Oxford, v.6, n.34, p.413-8. Dec. 2007.

Tortora, G J.; Funke, B R.; Case, C L. *Microbiologia* 2012. 10. ed. Porto Alegre: Artmed.

TRENTIN, D. S.; SILVA, D. B.; AMARAL, M. W.; et al. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. *PloS one*, v. 8, n. 6, p. e66257, 2013.

Treszl A, Kocsis I, Szathmári M, Schuler A, Héninger E, Tulassay T, Vársárhelyi B 2003. Genetic variants of TNF-[FC12]a, IL-1beta, IL-4 receptor [FC12]a-chain, IL-6 and IL-10 genes are not risk factors for sepsis in low-birth-weight infants. *Biol Neonate* 83: 241-245.

Turton JF, Baklan H, Siu LK, Kaufmann ME, Pitt TL. 2008. Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella* sp. and comparison of isolates within these serotypes. *FEMS Microbiol Lett* 284: 247–252.

Turton JF, Baklan H, Siu LK, Kaufmann ME, Pitt TL. 2008. Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella* sp. and comparison of isolates within these serotypes. *FEMS Microbiol Lett* 284: 247–252.

van Well GT, Sanders MS, Ouburg S, et al. Single nucleotide polymorphisms in pathogen recognition receptor genes are associated with susceptibility to meningococcal meningitis in a pediatric cohort. *PLoSOne* 2013; 8: e64252.

Vargas JM, Mochi MPM, Nunez JM, Caceres M, Mochi S, Moreno SC, JureMA. 2019. Virulence factors and clinical patterns of multiple-clone hypermucoviscous KPC-2 producing *K. pneumoniae*. *Heliyon* 23.

VILLAR J, MACA-MEYER N, PEREZ-MENDEZ L, FLORES C. Bench-to-bedside review: understanding genetic predisposition to sepsis. *Critical Care, London*, v. 8, n.3, p. 180-9, Jun. 2004.

Wang H, Guo S, Wan C, Yang T, Zeng N, Wu Y, Chen L, Shen Y, Wen F. 2017. Tumor necrosis factor- $\alpha$  -308 G/A polymorphism and risk of sepsis, septic shock, and mortality: an updated meta-analysis. *Oncotarget* 55: 94910-94919.

Warlé MC, Farhan A, Metselaar HJ, Hop WCJ, Perrey C, Zondervan PE, Kap M, Kwekkeboom J, Ijermans JNM, Tilanus HW, Pravica V, Hutchinson IV, Bouman GJ. 2003. Are Cytokine Gene Polymorphisms Related to In Vitro Cytokine Production Profiles? *Liver Transplantation* 9: 170-181.

Watanabe, M., S. Iyobe, M. Inoue, and S. Mitsuhashi. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1991. 35:147–151.

WATTANATHUM A, MANOCHA S, GROSHAUS H, RUSSELL JA, WALLEY KR. Interleukin-10 haplotype associated with increased mortality in critically ill patients with sepsis from pneumonia but not in patients with extrapulmonary sepsis. *Chest*, Chicago, v.128, n. 3, p. 1690-8, Sep. 2005.

WELDHAGEN, G.F. Integrons and beta-lactamases—a novel perspective on resistance. *Int. J. Antimicrob*, 2004. Agents 23, 556–562.

Wen AQ, Wang J, Feng K, Zhu PF, Wang ZG, Jiang JX: Effects of haplotypes in the interleukin 1 beta promoter on lipopolysaccharide-induced interleukin 1 beta expression. *Shock* 2006, 26:25-30.

Wiatrowski HA, Barkay T. 2005 Monitoring of microbial metal transformations in the environment. *Curr Opin Biotechnol.* Jun;16(3):261-8.

WILKSCH, J. J.; YANG, J.; CLEMENTS, A.; et al. MrkH, a novel c-di-GMP dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 8, p. e1002204, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3161979&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

WILLIAMS, P.; LAMBERT, P. A; BROWN, M. R.; JONES, R. J. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *Journal of general microbiology*, v. 129, n. 7, p. 2181–91, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6195306>>. .

Witsell A L and Schook L B, “Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth regulator during macrophage differentiation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 10, pp. 4754–4758, 1992.

Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, Vázquez GJ, Santé MI, Aquino EE, et al. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* [Internet]. 2009 Apr [cited 2011 Oct 30];53(4):1660–4.

Wright V, Hibberd M and Levin M. Genetic polymorphisms in host response to meningococcal infection: The role of susceptibility and severity genes. *Vaccine* 2009; 27: 90–102.

Wu H P, Chen C K, Chung K, Tseng J C, Hua C C, Liu Y C, Chuang D Y e Yang C H: Serial cytokine levels in patients with severe sepsis. *Inflamm Res* 58(7): 385-393, 2009.

WU, M.-C.; LIN, T.-L.; HSIEH, P.-F.; YANG, H.-C.; WANG, J.-T. Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess. *PloSone*, v. 6, n. 8, p. e23500, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3155550&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

Xing Z, Gauldie J, Cox G et al., "IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 101, no. 2, pp. 311–320, 1998.

Xu M, Fu Y, Kong H, Chen X, Chen Y, Li L, Yang Q. 2018. Bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of blaKPC, virulence factors and their impacts on clinical outcome. *BMC Infectious Diseases* 18: 1-9.

Yigit H, Queenan a. M, 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.* [Internet]. 2008 Jan 23 [cited 2011 Sep 4];52(2):809–809.

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*. *Society.* 2001;45(4):1151–61.

Yoshizawa K, Naruto M, and Ida N, "Injection time of interleukin-6 determines fatal outcome in experimental endotoxin shock," *Journal of Interferon and Cytokine Research*, vol. 16, no. 12, pp. 995–1000, 1996.

Zeng L, Gu W, Chen K, Jiang D, Zhang L, Du D, Hu P, Liu Q, Huang S, Jiang J. 2009. Clinical relevance of the interleukin 10 promoter polymorphisms in Chinese Han patients with major trauma: genetic association studies. *Critical Care* 13: 1-8.

ZHANGDL,ZHENGHM,YUBJ,JIANGZW,LIJS.Associationofpolymorphisms of IL and CD14 genes with acute severe pancreatitis and septic shock. *World JournalofGastroenterology,Beijing,v.11,n.28,p.4409-13,Jul.2005.*

## **APÊNDICES:**

### **APÊNDICE A**

TCLE aplicado a todos os paciente e controles do estudo.

#### **LABORATÓRIO DO CEONHPE/UPE, SETOR DE BIOLOGIA MOLECULAR -**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (CESSÃO, GUARDA E USO DE MATERIAL BIOLÓGICO)**

O laboratório do CEONHPE-UPE desenvolve uma atividade que visa aumentar conhecimento sobre susceptibilidade a infecção bacteriana. Consequentemente, servirá para oferecer novas possibilidades de diagnóstico, tratamento, controle e prevenção para as doenças que tratamos aqui. Essa atividade envolve o armazenamento de parte do material biológico retirado para exame ou para tratamento, após autorização dos pacientes.

Como o senhor(a) foi matriculado no HUOC, onde fará exames e tratamento especializado, está sendo convidado(a) a participar voluntariamente do projeto de pesquisa intitulado “**Análise dos polimorfismos dos genes *MBL2, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, TNF $\alpha$  e TNF- $\beta$*  em pacientes internados em unidade hospitalar com quadro de infecção bacteriana com diferentes graus de virulência**” permitindo a guarda do material biológico que sobra dos procedimentos para exames realizados em nosso hospital. A pesquisa é simples e não representará qualquer risco de ordem física ou psicológica para o senhor(a). Também, informações clínicas, como o seu diagnóstico, serão associadas ao material biológico que for armazenado.

Tanto os materiais coletados como as informações registradas serão guardadas no laboratório do CEONHPE (setor da Biologia Molecular) e poderão ser usadas apenas em pesquisas aprovadas pelo Comitê de Ética do Complexo Hospitalar HUOC/PROCAPE, que é o órgão responsável por garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todas as pessoas que se voluntariam à participar em atividades científicas. O(a) senhor(a) tem direito a conhecer as informações e os resultados das pesquisas que usarem o seu material biológico. Esses resultados podem ser informados pelos próprios pesquisadores, ou pelo

seu médico ou através do Setor de Biologia Molecular do CEONHPE, já que podemos ser o elo entre você e os pesquisadores que usarem suas amostras biológicas.

Caso o Laboratório CEONHPE deixe de funcionar e/ou suas amostras biológicas sejam transferidas para outra instituição ou destruídas por algum motivo, o senhor(a) será devidamente informado.

Garantimos que sua participação não implicará em nenhum procedimento ou despesa adicional para o senhor(a) e que sua identidade será sempre mantida em sigilo. Reafirmamos que sua participação é voluntária e que o senhor(a) pode recusar-se a ceder o material ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem penalidades, sem prejuízos e sem mudança no seu tratamento nesta instituição.

É importante esclarecer que o consentimento para uso de materiais biológicos em pesquisas não resulta em privilégios ou benefícios econômicos para o senhor(a) e os resultados obtidos servirão para aumentar o conhecimento sobre as doenças tratadas no HUOC, melhorando a qualidade da assistência prestada à população em geral.

A assinatura deste termo de consentimento autoriza a sua participação nesta pesquisa, assim como a utilização de:

- 1 - Os dados clínicos registrados no prontuário médico;
- 2 - Amostra de sangue periférico encaminhadas para o Laboratório de Bacteriologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) a fim de investigar a ocorrência de infecção no sangue.

Após receber essas informações, o(a) senhor(a) poderá dar seu consentimento assinando este documento e escolhendo a maneira mais adequada para utilização dos seus materiais biológicos.

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Rubrica do participante

Rubrica do responsável pela obtenção do

TCLE

Se o(a) senhor(a) tiver algum comentário ou dúvida sobre este trabalho, entre em contato com o Setor de Biologia Molecular, no 1º andar do prédio do Centro de Oncologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz. Se o Sr(a) tiver perguntas com

relação aos seus direitos como participante desta pesquisa, também pode contar com uma terceira pessoa imparcial do Comitê de Ética do Complexo Hospitalar HUOC/PROCAPE - (Fone/Fax: 81-31841271/81-31841460, Email: cep\_huoc.procape@yahoo.com.br), localizado no Pavilhão Ovídio Montenegro – 1º andar – Rua Arnóbio Marques, 310 – Santo Amaro – 50100-130 – Recife, PE. Ou ainda pode entrar em contato com o pesquisador responsável, AMANDA CRISTINA DA COSTA GUIMARÃES, pelo fone: (81) 99807-6678 e e-mail: amandaguimaraes\_12@hotmail.com.

### CONSENTIMENTO

Declaro estar claro para mim quais são os objetivos desta atividade, como participar, que terei garantia de confidencialidade e a certeza de que obterei esclarecimentos a qualquer momento. Estou ciente que minha participação é isenta de despesas ou ganhos financeiros e que isto não irá interferir no meu tratamento.

Se os meus materiais biológicos forem utilizados em pesquisas aprovadas, escolho livremente a opção abaixo assinalada.

Autorizo a utilização dos meus materiais biológicos sem necessidade de novo consentimento.

Desejo ser contactado para autorizar o uso dos meus materiais biológicos cada vez que forem utilizados.

Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para armazenamento de minhas amostras biológicas. Eu recebi uma via assinada deste formulário de consentimento, uma via ficou no meu prontuário e outra via ficou o Laboratório do CEONHPE.

\_\_\_\_\_

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome e assinatura do participante

Data

---

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinatura do Responsável Legal/Testemunha Imparcial

Data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente (ou de seu representante legal) para a cessão de material biológico para armazenamento no Laboratório do CEONHPE-HUOC/UPE.

---

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome e assinatura do responsável pela obtenção do Termo

Data



## APÊNDICE B

Artigo 1 submetido à revista JOURNAL OF HOSPITAL INFECTION, que tem como fator de impacto 3,704, e Qualis é A2 em Biotecnologia e em Ciências Biológicas I.

VIRULENCE AND RESISTANCE IN DISTINCT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* SEQUENCE TYPES CAUSING BLOODSTREAM INFECTIONS IN PAEDIATRIC ONCOLOGICAL PATIENTS.

Amanda Cristina da Costa Guimarães<sup>1</sup>, Marinalda Anselmo Vilela<sup>1</sup>, Anna Carolina Soares Almeida<sup>1,2</sup>, Maria Tereza Cartaxo Muniz<sup>3</sup>, Marcia Maria Camargo de Moraes<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratory of Microbial Resistance, Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco, Rua Arnóbio Marques, 310, 50100-130, Recife, Brazil

<sup>2</sup>Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, Avenida Dom Manuel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Brasil

<sup>3</sup>Paediatric Oncology Center, University Hospital Oswaldo Cruz, University of Pernambuco, Rua Arnóbio Marques, 310, 50100-130, Recife, Brazil

Corresponding author:

e-mail address: [marcia.morais@upe.br](mailto:marcia.morais@upe.br)

Telephone number: +55 81 3183 3300, Fax number +55 81 3183 3308

Running title: *K. pneumoniae* in oncological patients

### Summary

Background: Bacterial bloodstream infections in paediatric oncological patients is still highly prevalent. *Klebsiella pneumoniae* is frequently related to paediatric health-care infections and its virulence and antimicrobial resistance are challenging for treatment. Aim: In this work we evaluated virulence, resistance and the genetic variability of *K. pneumoniae* causing bloodstream infections in these patients. Methods: Nine strains of *K. pneumoniae* from blood cultures from paediatric oncological patients were investigated for the presence of virulence and antimicrobial resistance genes, by specific PCRs. Sequence Type determinations were carried out by MLST. Capsule production was quantified by determination of uronic acid concentration. Findings: The

isolates showed high genetic heterogeneity, with identification of seven sequence types (STs). By contrast, virulence genes and increased capsule production were present and similar in all the isolates. In addition, ESBL genes were detected in most of the isolates. Conclusions: Distinct STs of *K. pneumoniae* isolates were able to accumulate factors of virulence and resistance independently.

Keywords: virulence, paediatric cancer, *K. pneumoniae*, bacterial resistance

## Introduction

Childhood cancer varies according to the histological type, primary location of the tumor, ethnicity, gender and age. The incidence of global registered cancers in children has increased since 1980s [1]. During treatment, fever and neutropenia are usually present as a common complication, which has been the reason for updates in guidelines for its management, that includes empirical antibiotic therapy [2]. However, despite the progress in the management, bacterial bloodstream infections in children with malignancy continues to be highly prevalent, counting for nearly half of the nosocomial infections attributed to a bacterial pathogen [3].

*Klebsiella pneumoniae* is a Gram-negative, rod-shaped bacterium that is frequently related to paediatric health-care infections and associated to morbidity and mortality [4]. The ability of *K. pneumoniae* to be the causative agent of many infections is related to its capacity to produce numerous virulence factors. The predominant virulence factors are capsule, lipopolysaccharide (LPS), siderophores and fimbriae [5]. In addition, hypervirulent strains can cause infections in both healthy and immunocompromised people, due to enhanced capsule production and other bacterial factors [6]. Virulence and the emergency of antimicrobial resistance mechanisms cause such infections to become a big obstacle. *K. pneumoniae* frequently displays a multidrug-resistant phenotype (MDR) [7] and is commonly reported to produce ESBLs (extended-spectrum beta-lactamases) and carbapenemases (mainly *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - KPC), which render resistance to cephalosporins and carbapenems, respectively [8].

Despite the challenges that usually characterize the treatment of cancer patients, infections by virulent and multidrug-resistant bacteria may make treatment even more difficult, since these infections have potential to progress rapidly. Characteristically, *K. pneumoniae* uses defensive rather than offensive strategies against host immune defenses [6]. Since patients with malignancy commonly have their immune defenses weakened, one could suppose that even non-virulent isolates would be causing bloodstream infections in these patients. In this work, we evaluated the

virulence and antimicrobial susceptibility, as well the genetic variability of *K. pneumoniae* isolates causing blood stream infections in paediatric oncological patients.

## Methods

### *Bacterial isolates*

Nine strains of *K. pneumoniae* (Kp1-Kp9) were collected from blood cultures of patients admitted to the Paediatric Oncology Center of a Public University Hospital in Recife, Brazil, in 2017, during a period of two months. The strains were obtained from the routine cultures for bacteriological diagnosis and corresponded to the all *K. pneumoniae* isolates detected in blood samples of the period. Only the isolates present in three consecutive patient's blood samples were considered for this study, discarding some potential bias due to contamination during collection. Bacterial identification and antimicrobial susceptibility tests were performed by automated method (VITEK II, Biomerieux) and BrCAST (Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – 2018) guideline was used to interpret the values of MIC (minimum inhibitory concentration) [9]. The isolates were stored at -80°C in Muller Hinton broth containing 15% glycerol until the day of use.

### *Molecular analysis*

The allelic profile was determined by Multilocus sequence typing (MLST), according to Institute Pasteur MLST database (<http://www.pasteur.fr/mlst/>). Alleles and sequence types (STs) were assigned in accordance with the sequences previously deposited in the data base. The clonal relationship of the isolates was determined by ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) [10] and the software Mega 5.0 was used to generate the dendrogram.

### *PCR analysis of resistance and virulence genes*

The investigation of the *bla*<sub>CTX-M</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> beta-lactamase genes [11] were carried out using specific primers. The reactions were prepared to a final volume of 25µL containing 1U of Taq Polymerase ( Promega Biotecnologia, São Paulo, Brazil), Taq Polymerase 1X Buffer (Promega Biotecnologia, São Paulo, Brazil), 20µM dNTP (Promega Biotecnologia, São Paulo, Brazil), 2mM MgCl<sub>2</sub> (Promega Biotecnologia, São Paulo, Brazil), 0.4µM of each primer (Exxtend Biotecnologia, Campinas, Brazil ) and 20ng (for antimicrobial resistance genes) of bacterial DNA. Reactions were performed in thermal cycler MyGENE™ Series Gradient Thermal Cycler from LongGene™. The virulence genes included *fimH* (fimbriae type I) and *mrkD* (fimbriae type III)

[12], *rmpA*[13] and *magA*(mucoviscosity phenotype) [14], *kfu*(iron uptake system) [15], *wabG*(biosynthesis of LPS) [16] and *uge*(biosynthesis of LPS/capsule) [17].

#### *Purification and sequencing of PCR products*

The products obtained from the PCR reactions were purified by using the kit Wizard™ SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Biotecnologia, São Paulo, Brazil), according to the manufacturer's instructions. Purified amplification products were sequenced using the 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). The sequences obtained were aligned and analyzed in the BioEdit™ software and compared with those sequences available on GenBank Database by Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>).

#### *Polysaccharide Capsule analysis*

Cell-associated capsular material was purified by the phenol extraction method [18]. Capsule (CPS) was quantified by determination of uronic acid concentration using the modified carbazole method, as described by Rahn and Whitfield [19]. Cell-associated capsular material was purified by the phenol extraction method. Briefly, bacterial cells were cultured for 24h in 5 mL of LB medium, at 180 rpm, until reaching the value 3.0 on the McFarland scale. This culture was then transferred to 5mL LB medium until and 2.0 on the McFarland scale. Further, cells were collected by centrifugation at 5000 x g, 15 min, 5°C. The cell pellet was washed with 1.0 mL of distilled water and resuspended in 500µl of distilled water (viable cells were determined from this suspension by plating). After two minutes of incubating the suspension at 68°C, 500µl phenol were added and incubation continued for another 30 min. After cooling the mixture to room temperature, 500µL of chloroform were added and the aqueous phase was recovered by centrifugation. The CPS was precipitated from the aqueous phase by adding ethanol at -20°C and resuspended in 1 mL of distilled water. CPS was quantified as described [18]. All the experiments were done in triplicates of bacterial cultures. The *K. pneumoniae* ATCC 700603 was used as reference strain. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the average values compared using Tukey test and the software Assistat version 7.7 beta (<http://www.assistat.com>) [20].

#### *Ethical approval*

This work was approved by the Ethics Committee of the University of Pernambuco, Brazil [Reference CAAE: 53611616.1.0000.5192].

## **Results**

During the collection period, twenty-two cases of *K pneumoniae* infections were diagnosed in the Paediatric Oncology Center patients. Of these cases, nine isolates were obtained from bloodstream infections and were selected for the present study.

The isolates included in the study showed distinct Sequence Types, with only STs 502 and 17 being detected in two isolates each (Table 1). Moreover, ERIC-PCR results showed a low genetic similarity between the isolates but grouped together the ones belonging to the same ST (Figure 1). However, despite the genetic variability, all the isolates showed high similarity for virulence. None presented *rmpA* or *magA* gene, but showed all the other virulence genes investigated, except Kp4, which was negative for *uge* gene detection. This finding revealed the accumulation of virulence factors by every bacterial isolate. In addition, it was observed that all the isolates had a significant higher quantity of capsule, when compared to the reference strain *K. pneumoniae* ATCC 700603 (Table 2).

Antimicrobial susceptibility tests showed that 56% were not susceptible to 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> generation's cephalosporins. In addition, gentamicin and ciprofloxacin were *in vitro* ineffective against 44% and 33% of the isolates, respectively. On the other hand, none of the isolates showed resistance to carbapenems, amikacin and colistin (Table 1). The analysis of genetic determinants of resistance revealed the presence of four *bla<sub>SHV</sub>* - ESBL genes in the isolates studied, but the prevalence of *bla<sub>SHV-11</sub>* (non-ESBL). In addition, ESBL genes *bla<sub>CTX-M</sub>* were detected in six isolates (Table 1). Together, these gene groups conferred the ability to produce ESBLs to most of the isolates, except for Kp9.

## Discussion

The results presented in this work indicate that the nine *K. pneumoniae* causing bloodstream infections had independent origins and did not arise from clonal spread, since we noted that the more genetically close isolates showed about 60% similarity, while most of them showed less than 50% similarity. Furthermore, the seven STs identified reinforces the high genetic variability. According to the Institute Pasteur MLST Database, the ST 502, to which two isolates belonged, has already been described in three bacterial urine culture samples, in 2013, in Mexico and Brazil, and later in 2014, in China. In addition, other two isolates shared the ST 17, which has been described in more than 83 isolates distributed worldwide, since 2013, and can carry cephalosporin and carbapenem resistance genes. Most of the other STs detected were described in a few isolates and places, such as ST 196 (North America), ST 978 (South America - Colombia) and ST 1998 (Europe – Netherlands and Ireland). By contrast, ST 111 and ST 11 are often identified in many isolates worldwide. Particularly, the ST 11, which together with ST258 and ST437 form the clonal

complex (CC) 258 [21; 22], is widespread in Brazil. It should be noted that ST 11 has been described since 2011 in this hospital, where it has probably been maintained ever since [23].

An important finding is that despite the big variability, the virulence was not influenced or related to specific strains or genetic lineage. *K. pneumoniae* is a pathogen that is known to use its ability to grow and survive by evading the host defenses instead of suppressing the action of different components of the host immune system [6]. In view of this, it could be expected that patients with malignancies, that usually are in treatment with chemotherapy, could be infected by less-virulent strains. However, all the isolates maintained the most prominent virulence factors for this species. Based in this finding, it can be assumed that these infections were caused by bacteria already adapted to the hospital environment, causing opportunistic infections in any of the patients, hence the importance of maintaining the arsenal of virulence. The presence of genes coding for fimbriae type I and type III confers an important selective advantage to the microorganism since it will provide an improved ability of fixation in both abiotic and biotic surfaces making them more persistent in patients. However, despite these two adhesines are usually found in almost all *K. pneumoniae* isolates, the expression of both is regulated according to the anatomical site [24]. The *kfu* gene, present on the *K. pneumoniae* chromosome, is involved in iron uptake and in humans is more related to invasive than non-invasive clinical strains [15], suggesting the possibility of these strains being able to cause tissue invasive diseases. The gene *wabG* is expected to be present in almost 100% of *K. pneumoniae* isolates, since strains which lack this gene are unable to generate the complete structure of LPS [25]. Similarly, the *uge* gene is considered essential for *K. pneumoniae* virulence and in the absence of this gene, the bacteria are unable to cause infections in experimental animal models [26]. However, in this study, one isolate causing bloodstream infection did not present this gene, indicating that other factors were effective in maintaining the virulence of the bacterial isolate. Besides carrying these virulence genes, the significant capsule production by the isolates reinforces their high virulence capacity. Capsules are one of the most important factors for virulence, since non encapsulated strains often lose their virulence ability [6]. In view of the results, the bacterial isolates demonstrated high capacity of fixation, propagation and persistence.

Regarding antimicrobial resistance, there was no detection of carbapenemase production in the bacterial isolates. However, the presence of CTX-M cefotaximase, an enzyme commonly detected in *K. pneumoniae* clinical isolates, is noteworthy. In addition, other ESBL enzymes from the SHV group were present. In fact, studies have shown the increased prevalence of third-generation cephalosporin-resistant isolates in infections involving children [27] and antibiotic resistance has been related with significantly higher mortality in children with cancer [28].

Taken together, the results presented in this work highlight the worrying panorama of the common presence of virulent and resistant *K. pneumoniae* isolates causing bloodstream infections in the paediatric oncology patients, despite their genetic heterogeneity. The finding that the bacterial isolates were able to accumulate independently, factors of virulence and resistance, strongly shows that efforts need to be undertaken to contain selective pressures in hospital environments, especially in the oncological sectors, that will be advantageous for a species with such adaptability.

### **Acknowledgments**

We thank to Technological Platform for Genomic and Gene Expression (CB/UFPE), for its assistance in sequencing PCR products. We also thank the team of curators of the Institut Pasteur MLST and whole genome MLST databases for curating the data and making them publicly available at <http://bigsd.bpasteur.fr/>?

### **Conflict of Interest Statement**

None declared.

### **Fundingsources**

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – Finance code 001) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - Brasil).

### **References**

- [1] Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, Moreno F, Dolya A, Bray F, Hesselning P, Shin HY, Stiller CA. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *Lancet Oncol* 2017; 18: 719–31. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30186-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30186-9)
- [2] Lehrnbecher, T.; Robinson, P.; Fisher, B, Alexander S, Ammann RA, Beauchemin M, Carlesse F, Groll AH, Haeusler GM, Santolaya M, Steinbach WJ, Castagnola E, Davis BL, Dupuis LL, Gaur AH, Tissing WJE, Zaoutis T, Phillips R, and Sung L. Guideline for the Management of Fever and Neutropenia in Children With Cancer and Hematopoietic Stem-Cell

Transplantation Recipients: 2017 Update. *Journal of Clinical Oncology* 2017, 35, 2082–2094.  
<https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.7017>

[3] Simon A, Furtwängler R, Graf N, Laws HJ, Voigt S, Piening B, Geffers C, Agyemmann P, Ammann RA. Surveillance of bloodstream infections in pediatric cancer centers – what have we learned and how do we move on? *GMS Hygiene and Infection Control* 2016, Vol. 11.  
<https://doi.org/10.3205/dgkh000271>

[4] Aljabari S, Balch A, Larsen GY, Fluchel M, Workman JK. Severe Sepsis-Associated Morbidity and Mortality among Critically Ill Children with Cancer. *Journal Pediatric Intensive Care*, 2018; 5. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1676658>

[5] Ali, AM.; Al-kakei, SN. Virulence factors genotyping of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Baghdad. *Reviews in Medical Microbiology*, 2019, Volume 30 - Issue 1 - p 36–46.  
<http://dx.doi.org/10.1097/MRM.000000000000151>

[6] Paczosa MK and Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology*, 2016 Volume 80, Number 3.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>

[7] Piperaki ET, Syrogiannopoulos GA, Tzouveleki LS, Daikos GL. *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2017 Volume 36, Number 10. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001675>

[8] Spagnolo AM, Orlando P, Panatto D, Han JH. An overview of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and control measures. *Reviews in Medical Microbiology* 2014; 25:7-14. <https://doi.org/10.1017/ice.2015.254>

[9] Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – BrCAST, 2018.  
<http://brcast.org.br/>

[10] Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C, Gao J, Zhang X, Qi C, Gao J, Wang Y, Cai Y, Miao Z, Yao M, Schlenker G. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine houses surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environmental Research* 2009; 109:511-517. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.02.014>



- [11] CAO, V, Loan HK, Hoang NK, Arlet G, and Courvalin P. Distribution of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Washington, 2002 v. 46, n. 12, p. 3739-3743. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.3739-3743.2002>
- [12] Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C, Decré D. wzi Gene Sequencing, a Rapid Method for Determination of Capsular Type for *Klebsiella* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013 Volume 51 Number 12 p. 4073–4078. <https://doi.org/10.1128/JCM.01924-13>
- [13] Hsu, CR., Lin, TL., Chen, YC, Chou HC, Wang JT. The role of *Klebsiella pneumoniae* rmpA in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. *Microbiology*. 2011, 157, 3446–3457. <https://doi.org/10.1099/mic.0.050336-0>
- [14] Fang CT, Chuang YP, Chia-Tung Shun CT, Chang SC, Wang JT. A Novel Virulence Gene in *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications. *The Journal of Experimental Medicine*, 2004, Volume 199, Number 5, 697–705. A Novel Virulence Gene in *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications
- [15] Ma LC, Fang CT, Lee CZ, Shun CT, Wang JT. Genomic Heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* Strains Is Associated with Primary Pyogenic Liver Abscess and Metastatic Infection. *The Journal of Infectious Diseases* 2005; 192:117–28. <https://doi.org/10.1086/430619>
- [16] Izquierdo, L, Coderch N, Piqué N, Bedini E, Corsaro MM, Merino S, Fresno S, Tomás JM, Regué M. The *Klebsiella pneumoniae* wabG Gene: Role in Biosynthesis of the Core Lipopolysaccharide and Virulence. *Journal of Bacteriology*, Washington, 2003. v. 185, n. 24, p. 7213–7221. <https://doi.org/10.1128/JB.185.24.7213-7221.2003>
- [17] Regué M, Hita B, Pique N, Izquierdo L, Merino S, Fresno S, Benedí BJ, Tomás JM. A gene, *uge*, is essential for *Klebsiella pneumoniae* virulence. *Infection and Immunity* 2004;72(1):54–61. <https://doi.org/10.1128/iai.72.1.54-61.2004>
- [18] Westphal, O, and Jann K. 1963. Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr. Chem.* 5:83–91.

- [19] Rahn A, and Whitfield C. Transcriptional organization and regulation of the Escherichia coli K30 group 1 capsule biosynthesis (cps) gene cluster. *Molecular Microbiology*, 2003. 47:1045–1060. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03354.x>
- [20] Assistat. Statistical Assistance. University Federal of Campina Grande, Paraíba, Brazil, 2017. Available: <http://www.assistat.com/indexi.html>.
- [21] Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Cantón R, Darini AL, Coque TM. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 2011, 55:3579–3583. <https://doi.org/10.1128/AAC.01783-10>
- [22] Castanheira M, Costello AJ, Deshpande LM, Ronald NJ. Expansion of clonal complex 258 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin American hospitals: report of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. 2012, 56, 1668–1669. <https://dx.doi.org/10.1128/AAC.05942-11>
- [23] Almeida, ACS; Cavalcanti FLS; Vilela, MA; Gales, AC; Morais Jr, MA; Morais, MMC. *Escherichia coli* ST 502 and *Klebsiella pneumoniae* ST 11 sharing an IncW plasmid harbouring the bla<sub>KPC-2</sub> gene in an Intensive Care Unit patient. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2012 373–374. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.05.022>
- [24] Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infection and Immunity* 2009. 77:5016–5024. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00585-09>.
- [25] Jung SW, Chae HJ, Park YJ, Yu JK, Kim SY, Lee HK, Lee JH, Kahng JM, Lee SO, Lee MK, Lim JH, Lee CH, Chang SJ, Ahn JY, Lee JW, Park YG. Microbiological and clinical characteristics of bacteraemia caused by the hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Epidemiology and Infection* 2013, 141:334–340. <https://doi.org/10.1017/S0950268812000933>

[26] Regué M, Hita B, Pique N, Izquierdo L, Merino S, Fresno S, Benedí VJ, Tomás JM. A Gene, Is Essential for *Klebsiella pneumoniae* Virulence. *Infection And Immunity*, 2004, p. 54–61. <https://doi.org/10.1128/iai.72.1.54-61.2004>

[27] Logan LK, Braykov NP, Weinstein RA, Laxminarayan R. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase–Producing and Third-Generation Cephalosporin-Resistant Enterobacteriaceae in Children: Trends in the United States, 1999–2011. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 2014 Vol. 3, No. 4, pp. 320–8. <https://doi.org/10.1093/jpids/piu010>

[28] Levene I, Elio Castagnola E, and Haeusler GM. Antibiotic-resistant Gram-negative Blood Stream Infections in Children With Cancer. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2018, Volume 37, Number 5. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001938>

Table 1. MIC values, beta-lactamase genes and sequence types (ST) of the *K. pneumoniae* isolates.

Isolate	MIC (ug/mL)*									Beta-lactamase genes		ST
	AMI	CAZ	COL	FEP	ERT	MER	IMI	GEN	CIP	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-like</sub>	
Kp1	<2	16	<0.5	4	<0.5	1,5	2	<1	1	11	2	978
Kp2	<2	16	<0.5	4	<0.5	<0.25	<0.25	8	<0.25	12	15	502
Kp3	<2	<1	<0.5	<1	<0.5	<0.25	<0.25	<1	<0.25	62	-	502
Kp4	<2	<1	<0.5	<1	<0.5	<0.25	<0.25	<1	<0.25	148	-	17
Kp5	<2	<1	<0.5	<1	<0.5	<0.25	0.5	<1	<0.25	11	2	1998
Kp6	8	8	<0.5	>64	<0.5	<0.25	<0.25	4	<0.25	11	2	17
Kp7	8	8	<0.5	>64	<0.5	0.5	<0.25	4	<0.25	11	15	196
Kp8	<2	<1	<0.5	<1	<0.5	<0.25	<0.25	<1	<0.5	85	15	111
Kp9	8	>64	<0.5	8	<0.5	<0.25	<0.25	>16	>4	11	-	11

\* MIC, minimum inhibitory concentration; AMI, amikacin; CAZ, ceftazidime; COL, colistin; FEP, cefepime; ERT, ertapenem; MER, meropenem; IMI, imipenem; GEN, gentamicin; CIP, ciprofloxacin.

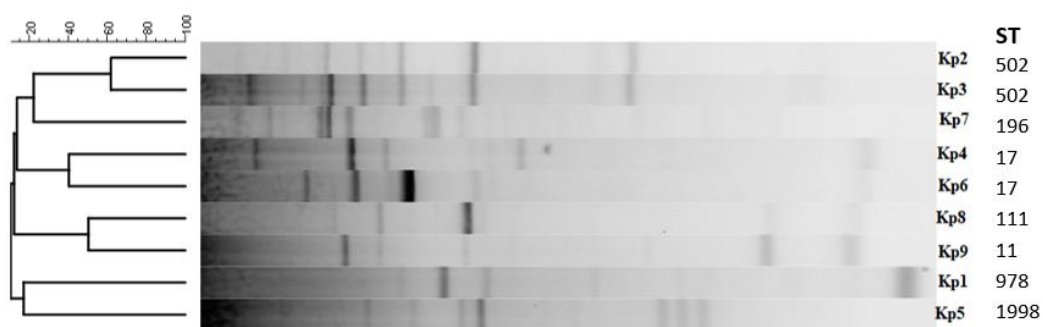
Table 2. Capsule quantification of *K. pneumoniae* isolates.

Isolate	mg uronic acid/10 <sup>9</sup> cells*
Kp1	1.330 <sup>b</sup>
Kp2	1.333 <sup>b</sup>

Kp3	1.307 <sup>b</sup>
Kp4	1.281 <sup>b</sup>
Kp5	1.308 <sup>b</sup>
Kp6	1.332 <sup>b</sup>
Kp7	1.315 <sup>b</sup>
Kp8	1.317 <sup>b</sup>
Kp9	1.259 <sup>b</sup>
ATCC 700603	1.159 <sup>a</sup>

\*Averages followed by the same letter in a single column do not differ according to Tukey test ( $p < 0.01$ )

Figure 1 caption: Alignment of ERIC PCR profiles of *K. pneumoniae* isolates



Legend to the Figure 1

Dendrogram generated from ERIC-PCR banding pattern of nine *K. pneumoniae* isolates causing bloodstream infections in paediatric oncological patients. Isolate names and their respective STs are on the right.



1 **APÊNDICE C**

2 Artigo 2 submetido à revista INFECTION AND IMMUNITY, que tem como fator de  
3 impacto 3,2, e Qualis é A2 em Biotecnologia e em Ciências Biológicas I.

4

5 IL10 -1082G/A POLYMORPHISM IS ASSOCIATED IN PATIENTS WITH BLOOD  
6 BACTERIAL INFECTION

7

8 Amanda C.C. Guimarães,<sup>a##\*</sup> Marinalda A. Vilela,<sup>b</sup> Anna Carolina S. Almeida,<sup>c</sup> Marcia  
9 M. C. Morais,<sup>a</sup> Maria T. C. Muniz<sup>d</sup>

10

11 <sup>a</sup>Laboratory of Microbial Resistance, Institute of Biological Sciences, University of  
12 Pernambuco, Recife, Brazil

13 <sup>b</sup>Laboratory of Microbial Resistance, Institute of Biological Sciences, University of  
14 Pernambuco, Recife, Brazil

15 <sup>c</sup>Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil

16 <sup>d</sup>Pediatric Oncology Center, University Hospital Oswaldo Cruz, University of  
17 Pernambuco, Recife, Brazil

18

19 Running Head: Genetic Marker for Bacterial Infection.

20

21 #Addresscorrespondenceto Amanda C. C. Guimarães,  
22 amandaguimaraes\_12@hotmail.com.

23 \*Presentaddress: Amanda C. C. Guimarães, Rua Cento e Noventa e Sete, 126, 53530-  
24 490, Abreu e Lima- PE, Brazil.

25

26 This is a contribution of the University of Pernambuco for early identification of a  
27 population susceptible to bacterial infections.

28

29

30 Abstract

31 *Klebsiella pneumoniae* is one of the most frequent pathogens causing hospital  
32 infection in hospitalized patients, since it has intrinsic resistance and virulence factors.  
33 Infections caused by these bacteria can result in septicemia and septic shock, which is  
34 triggered by lipopolysaccharides (LPS) present in the bacterial wall stimulating

35 neutrophils, macrophages, endothelial cells and muscles to an exacerbated production of  
36 pro-inflammatory cytokines. However, the modulation of this exacerbated response can  
37 be achieved by IL10. The aim of this study is to identify the polymorphisms in immunity  
38 genes related to patients susceptibility to develop hospital infections, and which virulence  
39 factors are present in these pathogens. We analyzed 100 patients for the TNF $\alpha$  -308 G/A,  
40 IL1 $\beta$ -511 C/T, IL6 -174 G/C and IL10 -1082 G/A polymorphisms, all by PCR method.  
41 The 41 strains of *K. pneumoniae* from blood cultures were investigated for the presence  
42 of antimicrobial virulence genes by specific PCR. The statistic analyse was performed by  
43 *Williams G test*, *Odds Ratio* (OR) with 95%. Quantitative and qualitative variables  
44 were analyzed using the *t-student test*. Our results revealed that homozygotes for the A  
45 allele in IL10 -1082 G/A have a four-fold increased risk of developing bacterial infection  
46 compared to heterozygous patients. In addition, we emphasize that 99.6% of *K.*  
47 *pneumoniae* are hypervirulent, since they present at least five virulence genes. In  
48 conclusion, our findings revealed that IL10 -1082G/A polymorphism and selected clinical  
49 features may be used as markers for the development of bacterial infection.

50

51

## 52 INTRODUCTION

53 The immune response plays a key role in the defense against infectious agents and  
54 constitutes the main impediment to the occurrence of disseminated infections, usually  
55 associated with a high mortality rate. It is also known that, for almost all infectious  
56 diseases, the number of individuals exposed to infection is higher than those which  
57 develop the disease, indicating that most people are able to destroy these microorganisms  
58 and prevent the progression of the disease. In contrast, immunological deficiencies, are  
59 strongly associated with increased susceptibility to infections<sup>1</sup>.

60 Hospitalized patients are exposed to a wide variety of pathogenic microorganisms,  
61 especially in the Intensive Care Unit (ICU), where the use of potent and broad spectrum  
62 antimicrobials is the rule and invasive procedures is routine<sup>2</sup>.

63 Among the most frequent pathogens causing nosocomial infections in hospitalized  
64 patients, *Klebsiella pneumoniae*, which can often be considered a Public Health problem  
65 due to its prevalence and high antimicrobial resistance rates<sup>2</sup>.

66 The ability of *K. pneumoniae* to thrive in the environment and at different body  
67 sites is related in large part to its intrinsic ability to regulate the expression of various

68 virulence factors that contribute to bacterial pathogenesis, including fimbrial adhesins,  
69 siderophores, S antigens and capsular antigens<sup>3</sup>.

70 Immune response cells are the main sources of cytokines and chemokines at the  
71 beginning of infections, which exert their action both in the innate and adaptive phases.  
72 Chemokines, due to their role of attracting cells to the lesion site, are very important in  
73 the host defense process<sup>4,5</sup>.

74 Infections caused by gram-negative bacteria may result in septicemia and septic  
75 shock, which is extremely serious and associated with a high mortality rate. Septic shock  
76 is triggered by lipopolysaccharides (LPS) present in the bacterial wall stimulating  
77 neutrophils, macrophages, endothelial cells and muscles to exacerbate proinflammatory  
78 cytokines (TNF $\alpha$ , IL1, IL6, IL8) and NO<sup>6</sup>.

79 IL1 is an important pro-inflammatory cytokine, which increases plasma platelet,  
80 prostaglandin and NO concentrations. These are potent vasodilators and induce septic  
81 shock<sup>4,7,8</sup>.

82 TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) plays an important role in the pathogenesis of the  
83 acute inflammatory response, and studies show a relation between the high level of TNF $\alpha$   
84 and the severity of sepsis<sup>4,7,9</sup>.

85 The gene locus of TNF $\alpha$  is positioned close to TNF $\beta$ . The SNP (single  
86 nucleotide polymorphism) in the -308 region appears to be of functional significance  
87 because it affects the regulation of TNF $\alpha$  at the transcriptional level<sup>9,10</sup>. Such a  
88 polymorphism present in the promoter region consists of a G (TNF $\alpha$ -308G) in the  
89 most frequent allele and an A (TNF $\alpha$ -308A) in the unusual (wild) allele, which can  
90 modify its gene expression<sup>9</sup>.

91 IL6 is another pro-inflammatory cytokine associated with increased  
92 occurrence of shock and death in septic patients. IL6 has a variety of biological effects,  
93 including the activation of B and T lymphocytes and the coagulation system, and the  
94 modulation of hematopoiesis<sup>7</sup>. In contrast to TNF $\alpha$  and IL1, the injection of IL6 by itself  
95 does not produce a sepsis-like state<sup>4</sup>. A key function of IL6 is the induction of fever and  
96 the mediation of the acute phase response, a systemic reaction to an inflammatory  
97 stimulus that is characterized by fever, leukocytosis, and the release of hepatic acute phase  
98 proteins such as C-reactive protein, complement components, fibrinogen, and ferritin. In  
99 vivo studies in IL6-knockout mice demonstrated that the deletion of the IL6 gene  
100 decreases lung inflammation in a model of acute lung injury and protects from mortality



101 and the development of organ failure in a zymosaninduced acute peritoneal  
102 inflammation<sup>4,7,9</sup>.

103 In the promoter region of the IL6 gene located on chromosome 7, there is a  
104 polymorphism with change from G to C at position -174<sup>4,7,11</sup> and another in position  
105 -597 with change from G to A<sup>4,7,11</sup>. In the intronic region, there are two  
106 polymorphisms, one in position -1753 (C → G), and another in position -2954 (G →  
107 C)<sup>12</sup>. with IL6 -174 G/C being the most studied in cases of bacterial sepsis<sup>4,11</sup>.

108 On the other hand, IL10 is an anti-inflammatory cytokine that decreases the  
109 production of IL1, IL6 and TNF $\alpha$  by monocytes. Changes in serum IL10 levels indicate  
110 little improvement in patients with SIRS<sup>4, 7, 11</sup>. IL10 is a cytokine that is produced by  
111 many immune cells, such as monocytes, macrophages, B and T lymphocytes, and NK  
112 cells (Natural killer cells)<sup>4</sup>. Functional studies widely revealed anti-inflammatory  
113 functions of IL10. *In vitro*, IL10 suppresses the production of proinflammatory mediators,  
114 such as TNF $\alpha$ , IL1, IL6, IFN $\gamma$ , and GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-  
115 stimulating fator), in immune cells<sup>4,6,7</sup>. In contrast, it was reported that IL10 has no effect  
116 on the constitutive expression of TGF $\beta$ , a cytokine with anti-inflammatory properties.  
117 Additionally, IL10 stimulates the production of IL1Ra and sTNFRs (Tumor Necrosis  
118 Factor Receptor), thereby neutralizing the proinflammatory actions of IL1 and TNF<sup>4</sup>.  
119 These results were supported *in vivo*. In an experimental murine model, the  
120 administration of recombinant IL10 protein protected mice from lethal endotoxemia, even  
121 when IL10 was injected 30 minutes after the LPS administration<sup>4,6</sup>. In contrast, the  
122 immunoneutralization of IL10 led to elevated levels of circulating TNF $\alpha$  and IL6 in mice<sup>4</sup>  
123 and reversed the ability of IL10 to protect mice from lethal endotoxemia<sup>6</sup>. Despite these  
124 clearly protective effects of IL10 in LPS induced pathologies, the actions of IL10 were  
125 not always beneficial in the CLP model of polymicrobial sepsis. In fact, the inhibition of  
126 IL10 12 hours after CLP markedly improved survival<sup>4</sup>. However, the administration of  
127 neutralizing IL10 antibodies at the time of CLP partially exacerbated mortality<sup>4</sup>. These  
128 findings indicate that the time of anti- IL10 antibody application is crucial for the  
129 outcome, and that IL10 can exhibit protective or harmful effects in the course of  
130 sepsis<sup>4,6,7</sup>.

131 On the other hand, IL10 is an anti-inflammatory cytokine that decreases the  
132 production of IL1, IL6 and TNF $\alpha$  by monocytes. Changes in serum IL10 levels  
133 indicate little improvement in patients with SIRS<sup>4,5,11</sup>. Three SNPs were found in the  
134 promoter region at the following positions: -1082 G/A, -819T/C and -592 A/C<sup>13</sup>. The

135 polymorphisms of the promoter region, IL10 -592 A and IL10 -819 T are associated  
136 with low IL10 production and a better response to interferon therapy (in hepatitis  
137 C), since SNP -1082 G/A is more related to anti-inflammatory activity during an  
138 infectious process<sup>14</sup>. Gowin et al. showed that in GG homozygous patients for the  
139 polymorphism in the region -1082 there are risk of developing septic shock, but no  
140 relationship with mortality was found<sup>4,5,11,15</sup>.

141 In a study by Zeng and colleagues, they investigated whether polymorphisms  
142 in the IL10 gene promoter affect sepsis susceptibility. They showed that the -1082A  
143 allele was associated with lower IL10 production after LPS stimulation and the  
144 development of sepsis after major trauma<sup>15</sup>. The aim of this study was to identify the  
145 polymorphisms in the TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 and IL10 genes are related to the  
146 susceptibility of patients to develop hospital infections and to characterize *Klebsiella*  
147 *pneumoniae* strains by their virulence factors.

148

## 149 **RESULTS**

150 The study group consists of 100 individuals with at least two blood samples, with  
151 intervals of 6 hours, positive for the same bacterial species. The study group consisted of  
152 42 female individuals with a mean age of 15.16 years and 58 males with a mean age of  
153 15.55 years, the youngest being 7 days old and the oldest with 28 years. The distribution  
154 of age groups was: 4% infants, 8% pre-school children, 17% school age, 34% adolescent  
155 and 37% young. In general, 51% were pediatric and 49% were adults. A total of 34  
156 patients were admitted to the ICU and submitted to mechanical ventilation, 43 patients  
157 were hospitalized in the oncology sector, and all of them had used antibiotic prophylaxis.  
158 When analyzing the polymorphism results, it was found that, of the 100 patients analyzed  
159 in this study, 11 were heterozygous for all the polymorphisms analyzed. Given that, 74  
160 (CT) were heterozygous for IL1 $\beta$ -511, 66 (GC) for IL6 -174, 59 (AG) for IL10 -1082 and  
161 46 (GA) for TNF $\alpha$ -308 as shown in Table 01.

162 IL1 $\beta$ -511 (C/T) and IL6 -174 (G/C) SNPs did not show the Hardy-Weinberg  
163 equilibrium. On the other hand, for the TNF $\alpha$  -308 (G/A) and IL10 -1082 (G/A) genes,  
164 the values of the predicted values of the Hardy-Weinberg model for the studied population  
165 were presented, as presented in Table 01. In this study 100 bacterial strains were obtained,  
166 and *Klebsiella pneumoniae* was the most prevalent (41). These isolates were then  
167 characterized in terms of presence of virulence genes.

168 The results showed that all the isolates were positive for *mrkD*, *fimH*, *kfu* and  
169 *wabG*, and only one isolate tested negative for *uge*. In addition, none of the strains were  
170 positive for *rmpA* and for serotypes K1 and K2. Taken together, these results indicated  
171 that the bacterial isolates showed remarkable homogeneity regarding virulence.(Table  
172 02).

173

## 174 **DISCUSSION**

175 Our findings reveal that homozygotes for the A allele in IL10 -1082 G/A have a  
176 four-fold increased risk of developing bacterial infection compared to heterozygous  
177 patients. This finding is consistent with those of Cardoso et al and Abu-Maziad et al, in  
178 which infants with IL10 genotype AA had an increased incidence of late sepsis, while  
179 Treszl et al did not observe a similar association. IL10 is a potent anti-inflammatory  
180 cytokine that increases the severity of infection in newborns at high levels<sup>30,31</sup>.  
181 Experimental evidence has shown that IL10 is a preeminent therapeutic candidate for  
182 irreversible septic shock<sup>32</sup>. As the allele A of IL10 contributes to the increased risk of  
183 septic shock is unclear. This IL10 -1082 (G/A) SNP is located within the promoter region  
184 of IL10 and is therefore presumed to affect the transcriptional activity of the gene.  
185 Because individuals with the A allele decreased circulating levels of IL10<sup>33</sup>, we  
186 hypothesized that AA homozygotes are prone to proinflammatory responses, which favor  
187 septic shock.

188 Given the functional significance of the -1082 and -592 polymorphisms and the  
189 ATA haplotype, we hypothesized that IL10 promoter polymorphisms would be important  
190 in influencing severity for the development of sepsis and morbidities in patients with  
191 infection by altering the balance of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines.  
192 There were no significant differences in age and gender between the different genotype  
193 groups, which minimized the influence of interfering factors. The cohort of patients was  
194 composed of young patients with a low history of coexisting morbidity. Similar to its  
195 association with IL10 production, genetic variations at the three loci tend to be associated  
196 with a lower risk of sepsis and morbidity. However, only the -1082 polymorphism showed  
197 statistical association, showing that patients with two A alleles had a significantly greater  
198 susceptibility to sepsis. The finding of no significant difference in the frequency of the  
199 GG genotype may be due to a small number of patients with the GG genotype in the  
200 present study. The results of Stanilova and colleagues<sup>34</sup> also revealed that the AA  
201 genotype of the -1082 locus was associated with lower IL-10 production in LPS,

202 phytohemagglutinin- or healthy peripheral blood leukocytes stimulated by pokeweed  
203 mitogen. Patients with severe sepsis showed a significant increase in allelic frequency A  
204 when compared to healthy controls. In addition, Gong and his colleagues<sup>35</sup> reported that  
205 the high production genotype of IL10 -1082 GG protects against organ failure and  
206 mortality in acute respiratory distress syndrome. It is increasingly recognized that the  
207 overall balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory responses is important  
208 in the development of sepsis after trauma. Therefore, it is reasonable that the IL10 -1082  
209 producing AA genotype can be used as a relevant risk estimate for organic dysfunction  
210 and sepsis. On the other hand, this is not consistent with the report by Schroeder and  
211 colleagues, who showed that the -592 polymorphism, but not -1082, was associated with  
212 morbidity in patients with significant trauma<sup>36</sup>. The different populations of patients  
213 studied may explain this discrepancy. The different populations of patients studied can  
214 explain this discrepancy, sometimes the studied population is mixed, in which case the  
215 SNPs in the IL10 gene can influence the expression of protein differently between ethnic  
216 groups or even between individuals<sup>15</sup>.

217 Zeng and colleagues performed a combination of results showing that patients  
218 with 2 ATA haplotypes have higher morbidity rates, but this is not statistically significant,  
219 although it is significantly associated with lower IL10 production. This is in agreement  
220 with previous reports<sup>37</sup>. This suggests that there is a lack of synergism between the  
221 polymorphisms -1082, -819 and -592 in relation to the development of sepsis in trauma  
222 patients. Other pathogenic factors should also be considered when explaining the current  
223 results. An important factor is the polygenic and multifactor involvement in the  
224 pathogenesis of sepsis and dysfunction of multiple organs after trauma<sup>38</sup>. In fact, there is  
225 increasing evidence indicating that genetic polymorphisms of other genes are associated  
226 with the occurrence of posttraumatic complications, such as IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , heat shock  
227 protein 70, IFN $\gamma$  and IL-18<sup>39,40</sup>. Susceptibility to sepsis and organ dysfunction in patients  
228 with infection may be the result of a combination of numerous genetic polymorphisms.  
229 Although our analyzes did not show statistical significance of TNF $\alpha$  -308 G/A with the  
230 risk of developing bacterial infection. Wang et al., Carried out a broad analysis of the -  
231 380 G/A TNF $\alpha$  polymorphism, they showed that the presence of this TNF $\alpha$   
232 polymorphism contributes significantly to the risk of sepsis and septic shock, but not to  
233 risk of sepsis-related mortality. Thus, this polymorphism appears to be a risk factor for  
234 sepsis, but not a predicted mortality<sup>9</sup>. According to some researchers the -308 G/A  
235 polymorphism in the TNF $\alpha$  gene has been shown to positively regulate the transcription

236 gene, leading to higher levels of expressed protein in the serum<sup>6,9</sup>. Elevated TNF $\alpha$  levels  
237 increase the inflammatory response and lead to multiple phenotypic and functional  
238 characteristics of sepsis; they also induce apoptosis and reduce immunity responsiveness  
239 and cellular function<sup>6</sup>.

240 Our sample, despite being a convenience sample, was considered adequate and is  
241 within the standard of several polymorphism studies for the studied population<sup>6,19</sup>, only  
242 has a size of 100 patients. Within this population, 41 samples were also studied for the  
243 presence of bacterial virulence gene, in order to know if the presence of gene could  
244 contribute to the success in the infection by strains of the species *Klebsiella pneumoniae*,  
245 since these are the most frequent organisms in hospital unit causing infection in patients<sup>41</sup>.  
246 The strains of our study were considered hypervirulent, a phenotype similar to that  
247 described by Xu et al., Where they describe strains accumulating at least three genes for  
248 distinct virulence factors, our strains, except for the Kp4 isolate, which does not present  
249 the uge gene, present at least five distinct virulence genes in their constitution, which  
250 together make them capable of being resistant to the host's immune system. This  
251 phenotype of hypervirulence is not common in clinical isolates, since bacterial strains that  
252 carry many mechanisms of resistance do not tend to accumulate mechanisms of virulence,  
253 mainly because they undergo different selective pressure processes<sup>42</sup>. It is important to  
254 note that seven patients studied for bacterial virulence factors, in addition to presenting  
255 five virulence genes were also homozygous AA to IL10 -1082, data not shown, this  
256 profile may further facilitate the susceptibility to bacterial infection, since several factors  
257 could be acting together and destabilizing the immune system of these patients, new  
258 studies are needed to confirm the clinical relevance of IL10 promoter polymorphisms in  
259 a larger cohort of patients with bacterial infection and to investigate the relationship of  
260 these SNPs with other genetic polymorphisms in the prediction of patients with bacterial  
261 infection in the blood and other factors bacterial virulence.

262

## 263 **CONCLUSION**

264 In conclusion, our findings revealed that IL10 -1082G/A and selected clinical  
265 features may be used as markers for the development of bacterial infection. Therefore,  
266 prognostic models including these biomarkers appear may allow the early identification  
267 of sepsis patients, and prevent it from becoming a septic shock. Although other studies  
268 are needed to evaluate the accuracy of these data in different populations and with other  
269 bacterial species. In this context, we speculate that IL10-induced immunosuppression

270 may have a more significant impact on the restriction of infection than on the outcome of  
271 sepsis. Finally, we believe that the enrichment of the ICU portfolio through the  
272 incorporation of strategies such as the genetic test for biomarkers of therapeutic response  
273 can improve the outcome of patients with sepsis and relieve the demand in the ICU in the  
274 future.

275 In fact, sepsis is a complicated clinical syndrome resulting from interactions  
276 between genotype and environment. Studies should also seek high-quality  
277 methodological and genotype distributions in the controls should be confirmed to satisfy  
278 functional studies that take into account genetics and environmental factors. The results  
279 of this work may help improve the risk assessment and precision treatment of patients  
280 with bacterial infection.

281

## 282 **MATERIALS AND METHODS**

283 The study group consisted of 100 patients (convenience sample within one  
284 year) from a public university hospital in Recife, Brazil, which were originated from  
285 the spontaneous demand to laboratory investigation for the presence of bacterial  
286 infection in the blood stream, from January 2017 to December 2018. For the controls  
287 patients we evaluate 200 samples from with negative blood cultures. The human  
288 DNA samples were obtained from the blood culture vials (BACT/ALERT®FA Plus).  
289 The DNA was stored in at -20°C until PCR-RFLP and PCR-ASA polymorphisms  
290 analysis using primers and specific conditions for these genes: TNF $\alpha$ <sup>16</sup>, IL1 $\beta$ <sup>17</sup>, IL6<sup>18</sup>  
291 and IL10<sup>19</sup>. The data obtained were analyzed by statistical tests: differences in the  
292 allele and genotype polymorphisms frequencies between patient and control groups  
293 were a compared using the *Williams G test* at a significance level of 5%. The *Odds*  
294 *Ratio* (OR) with 95% confidence intervals (CI) was used to verify the association  
295 between allelic and genotypic frequencies of the polymorphisms in order to  
296 determine if they are involved in the risk of developing bacterial infection.  
297 Associations were considered significant when  $p < 0.05$ . The Chi-square test ( $\chi^2$ ) was  
298 used to verify if the observed genotypic frequencies, adjusted with their expected,  
299 agree with the Hardy-Weinberg equilibrium hypothesis. Quantitative and qualitative  
300 variables were analyzed using the *t-student test*.

301 Bacterial analyzes were performed for 41 isolates of *Klebsiella pneumoniae*  
302 collected from the blood cultures. Identification and antimicrobial susceptibility tests

303 were performed by automated system (Vitek 2 Compact BioMerieux). These isolates  
 304 were stored in Mueller Hinton broth medium containing 15% glycerol at -80°C.

305 The virulence genes were investigated throughout the study by conventional  
 306 PCR according to the authors: *fimH* - fimbriae type I e *mrkD* - fimbriae type 3<sup>20</sup>;  
 307 *rmpA*<sup>21</sup>; *kfu*<sup>22</sup>; *wabG*<sup>23</sup> and *uge*<sup>24</sup>. Capsular antigens for capsular genes of types K1<sup>25</sup> and  
 308 K2<sup>26</sup> were also investigated.

309 The ethical aspects are in accordance with Resolution 466/2012 of the National  
 310 Health Council, where bioethical principles were respected. The project was approved by  
 311 the Ethics Committee of the University of Pernambuco, Brazil where this work was  
 312 performed (CAAE 53611616.1.0000.5192).

### 313 Acknowledgements

314 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de  
 315 Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), finance code 001.

316 The authors thank the Brazilian funding agencies CNPq and FACEPE.

317

318 **TABLE 1.** Distribution of allele and genotype frequencies and odds ratio of the  
 319 interleukins polymorphisms in patients with bacterial infection and controls.

Genotype	Patients n= 100(%)	Control n= 200(%)	<i>p</i> <sup>a</sup>	OR	95% CI	<i>p</i> <sup>b</sup>
<b><i>TNFA</i></b>						
GG	35 (35)	69 (34.5)		1	----	-
GA	46 (46)	98 (49)	0.83	0.92	0.54-1.58	0.8839
AA	19 (19)	33 (16.5)		1.13	0.56-2.27	0.8583
GA+AA	65 (65)	131 (65.5)		0.97	0.59-1.61	0.9658
<b><i>IL1β</i></b>						
CC	14 (14)	46 (23)		1	----	-
CT	74 (74)	129 (64.5)	0.15	1.88	0.97-3.65	0.0825
TT	12 (12)	25 (12.5)		1.57	0.63-3.92	0.4552
CT+TT	86 (86)	154 (77)		1.83	0.95-3.52	0.0922
<b><i>IL6</i></b>						
GG	22 (22)	58 (29)	0.31	1	----	-
GC	66 (66)	114 (57)		1.52	0.85-2.71	0.1937

CC	12 (12)	28 (14)		1.12	0.48-2.60	0.9429
GC+CC	78 (78)	142 (71)		1.44	0.82-2.54	0.2485

---

***IL10***

---

GG	23 (23)	73 (36.5)		1	----	-
GA	59 (59)	104 (52)	0.03	0.72	0.36-1.45	0.4654
AA	18 (18)	23 (11.5)		0.40	0.18-0.87	0.0331
GA+AA	77 (77)	127 (63.5)		0.59	0.30-1.15	0.1717

---

320 <sup>a</sup>: Test G Williams; OR: Odds Ratio; CI: Confidence Interval; <sup>b</sup>: Odds Ratio.

321



**TABLE 2. MIC values, beta-lactamase genes, sequence typing of the *Klebsiella***

*pneumoniae* isolates

ISOLATE	VIRULENCE GENES <sup>a</sup>					
	<i>fimH</i>	<i>mrkD</i>	<i>kfu</i>	<i>wabG</i>	<i>uge</i>	<i>rmpA</i>
Kp1	+	+	+	+	+	-
Kp2	+	+	+	+	+	-
Kp3	+	+	+	+	+	-
Kp4	+	+	+	+	-	-
Kp5	+	+	+	+	+	-
Kp6	+	+	+	+	+	-
Kp7	+	+	+	+	+	-
Kp8	+	+	+	+	+	-
Kp9	+	+	+	+	+	-
Kp10	+	+	+	+	+	-
Kp11	+	+	+	+	+	-
Kp12	+	+	+	+	+	-
Kp13	+	+	+	+	+	-
Kp14	+	+	+	+	+	-
Kp15	+	+	+	+	+	-
Kp16	+	+	+	+	+	-
Kp17	+	+	+	+	+	-
Kp18	+	+	+	+	+	-
Kp19	+	+	+	+	+	-
Kp20	+	+	+	+	+	-
Kp21	+	+	+	+	+	-
Kp22	+	+	+	+	+	-
Kp23	+	+	+	+	+	-
Kp24	+	+	+	+	+	-
Kp25	+	+	+	+	+	-
Kp26	+	+	+	+	+	-
Kp27	+	+	+	+	+	-
Kp28	+	+	+	+	+	-
Kp29	+	+	+	+	+	-

Kp30	+	+	+	+	+	-
Kp31	+	+	+	+	+	-
Kp32	+	+	+	+	+	-
Kp33	+	+	+	+	+	-
Kp34	+	+	+	+	+	-
Kp35	+	+	+	+	+	-
Kp36	+	+	+	+	+	-
Kp37	+	+	+	+	+	-
Kp38	+	+	+	+	+	-
Kp39	+	+	+	+	+	-
Kp40	+	+	+	+	+	-
Kp41	+	+	+	+	+	-

---

<sup>a</sup>*fimH* (fimbria type I), *mrkD* (fimbria type 3), *kfu* (iron uptake system), *wabG* (biosynthesis of LPS),

*ure*(operon of urease), *rmpA* (hypermucoviscosity).

#### References:

1. Beceiro A, Tomás M, Bou G. 2013. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? *Clinical Microbiology Reviews* 2: 185–230.
2. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. 2013. Hypervirulent hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* A new and dangerous breed. *Landes Bioscience* 4: 107–118.
3. Khaertynov KS, Anokhin VA, Rizvanov AA, Davidyuk YN, Semyenova DR, Lubin SA, Skvortsova NN. 2018. Virulence Factors and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated From Neonates With Sepsis *Frontiers in Medicine* 14:1-9.
4. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. 2013. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. *Mediators of Inflammation* 2013: 1-16.
5. Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, Ali MM, Mcguire F, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. 2013. Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. *in vivo* 27: 669-684.

6. Gowin E, Swiatek-Koscielna B, Kałuzna E, Strauss E, Wysocki J, Nowak J, Michalak M, Januskiewicz-Lewandowska D. 2018. How many single-nucleotide polymorphisms (SNPs) must be tested in order to prove susceptibility to bacterial meningitis in children? Analysis of 11 SNPs in seven genes involved in the immune response and their effect on the susceptibility to bacterial meningitis in children. *InnateImmunity* 24: 163–170.
7. Holub M, Lawrence DA, Andersen N, Davidová A, Beran O, Marešová V, Chalupa P. 2013. Cytokines and Chemokines as Biomarkers of Community-Acquired Bacterial Infection. *Mediators of Inflammation* 2013: 1-7.
8. Mayer-Barber KD, Yan B. 2017. Clash of the Cytokine Titans: counter-regulation of interleukin-1 and type I interferon-mediated inflammatory responses. *Cellular & Molecular Immunology* 14: 22–35.
9. Wang H, Guo S, Wan C, Yang T, Zeng N, Wu Y, Chen L, Shen Y, Wen F. 2017. Tumor necrosis factor- $\alpha$  -308 G/A polymorphism and risk of sepsis, septic shock, and mortality: an updated meta-analysis. ***Oncotarget* 55: 94910-94919.**
10. Malleo G, Mazzon E, Siriwardena A, Cuzzocrea S, 2007. Role of tumor necrosis factor-alpha in acute pancreatitis: from biological basis to clinical evidence. *SHOCK* 28:130-140.
11. Liu KT, Liu YHA, Lin CY, Kuo PL, Yen MC. 2016. Inflammatory molecules expression pattern for identifying pathogen species in febrile patient serum. *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE* 12: 312-318.
12. Martin PL, Cornacoff J, Prabhakar U, Lohr T, Treacy G. 2005. Preclinical Safety and Immune-Modulating Effects of Therapeutic Monoclonal Antibodies to Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Cynomolgus Macaques. *Journal of Immunotoxicology* 1:131–139.
13. Hazlett LD, Jiang X, McClellan SA. 2014. IL-10 Function, Regulation, and in Bacterial Keratitis. *JOURNAL OF OCULAR PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS* 30: 373-380.

14. Holmes CL, Russel JA, Walley KR. 2003. Genetic Polymorphisms in Sepsis and Septic Shock. *CHEST JOURNAL* 124: 1103-1115.
15. Zeng L, Gu W, Chen K, Jiang D, Zhang L, Du D, Hu P, Liu Q, Huang S, Jiang J. 2009. Clinical relevance of the interleukin 10 promoter polymorphisms in Chinese Han patients with major trauma: genetic association studies. *CriticalCare* 13: 1-8.
16. Cabrera M, Shaw MA, Sharpies C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM. 1995. Polymorphism in Tumor Necrosis Factor Genes Associated with Mucocutaneous Leishmaniasis. *J. Exp. Med* 182: 1259-1264.
17. Arman A, Yilmaz B, Coker A, Inanc N, Direskeneli H. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RN) and interleukin-1B gene polymorphisms in Turkish patients with rheumatoid arthritis. 2006. *ClinExpRheumatol* 24 (6): 643-8.
18. Lima Júnior SF, Tavares MMF, Macedo JL, Oliveira RS, Heráclio SA, Maia MMD, Souza PRE, Moura R, Crovella S. 2016. Influence of IL-6, IL-8, and TGF- $\beta$ 1 gene polymorphisms on the risk of human papillomavirus-infection in women from Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111(11): 663-669.
19. Warlé MC, Farhan A, Metselaar HJ, Hop WCJ, Perrey C, Zondervan PE, Kap M, Kwekkeboom J, Ijermans JNM, Tilanus HW, Pravica V, Hutchinson IV, Bouman GJ. 2003. Are Cytokine Gene Polymorphisms Related to In Vitro Cytokine Production Profiles? *LiverTrnasplantation* 9: 170-181.
20. Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C, Decré D. 2013. wzi Gene Sequencing, a Rapid Method for Determination of Capsular Type for Klebsiella Strains. *JournalofClinicalMicrobiology* 51: 4073– 4078.
21. Hsu, CR, Lin, TL, Chen, YC Chou HC, Wang JT. 2011. The role of Klebsiella pneumoniae rmpA in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. *Microbiology* 157: 3446–3457.
22. Ma LC, Fang CT, Lee CZ, Shun CT, Wang JT. 2005. Genomic Heterogeneity in Klebsiella pneumoniae Strains Is Associated with Primary Pyogenic Liver Abscess and Metastatic Infection. *The JournalofInfectiousDiseases* 192:117–28.

23. Izquierdo L, Coderch N, Piqué N, Bedini E, Corsaro MM, Merino S, Fresno S, Tomás JM, Regué M. 2003. The Klebsiella pneumoniae wabG Gene: Role in Biosynthesis of the Core Lipopolysaccharide and Virulence. *Journal of Bacteriology*, Washington 185: 7213–7221.

24. Regue, M, Climent NR, Abitiu N, Coderch NR, Merino S, Izquierdo L, Altarriba M, Tomás JM. 2001 Genetic Characterization of the Klebsiella pneumoniae waa Gene Cluster, Involved in Core Lipopolysaccharide Biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, Washington 183: 3564–3573.

25. Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. 2004. A Novel Virulence Gene in Klebsiella pneumoniae Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications. *The Journal of Experimental Medicine*, 2004, Volume 199, Number 5, 697–705.

26. Turton JF, Baklan H, Siu LK, Kaufmann ME, Pitt TL. 2008. Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in Klebsiella sp. and comparison of isolates within these serotypes. *FEMS Microbiol Lett* 284: 247–252.

27. Cardoso CP, Oliveira AJA, Botoni FA, Rezende ICP, Alves-Filho JC, Cunha FQ, Estanislau JASG, Magno LAV, Rios-Santos F. 2015. Interleukin-10 rs2227307 and CXCR2 rs1126579 polymorphisms modulate the predisposition to septic shock. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1-8.

28. Abu-Maziad A, Schaa K, Bell EF, Dagle JM, Cooper M, Marazita ML, Murray JC. 2010. Role of polymorphic variants as genetic modulators of infection in neonatal sepsis. *Pediatr Res* 68: 323-329.

29. Treszl A, Kocsis I, Szathmári M, Schuler A, Héninger E, Tulassay T, Vársárhelyi B. 2003. Genetic variants of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 receptor  $\alpha$ -chain, IL-6 and IL-10 genes are not risk factors for sepsis in low-birth-weight infants. *Biol Neonate* 83: 241-245.

30. Romagnoli C, Frezza S, Cingolani A, De Luca A, Puopolo M, De Carolis MP, Vento G, Antinori A, Tortorolo G 2001. Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis. *Eur J Pediatr* 160: 345-350.
31. Ng PC, Li K, Wong RPO, Chui K, Wong E, Li G, Fok TF 2003. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. *ArchDisChild Fetal Neonatal Ed* 88: F209-F213.
32. Latifi SQ, O'Riordan MA, Levine AD 2002. Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. *Infect Immun* 70: 4441-4446.
33. Schaaf BM, Boehmke F, Esnaashari H, Seitzer U, Kothe H, Maass M, Zabel P, Dalhoff K 2003. Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10-1082 gene promoter polymorphism. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 476-480.
34. Gong MN, Thompson BT, Williams PL, Zhou W, Wang MZ, Pothier L, Christiani DC. 2006. Interleukin-10 polymorphism in position - 1082 and acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J* 27:674-681.
35. Stanilova SA, Miteva LD, Karakolev ZT, Stefanov CS. 2006. Interleukin10-1082 promoter polymorphism in association with cytokine production and sepsis susceptibility. *Intensive Care Med* 32:260-266.
36. Schroeder O, Laun RA, Held B, Ekkernkamp A, Schulte KM. 2004. Association of interleukin-10 promoter polymorphism with the incidence of multiple organ dysfunction following major trauma: results of a prospective pilot study. *Shock* 21:306-310.
37. Reid CL, Perrey C, Pravica V, Hutchinson IV, Campbell IT. 2003. Genetic variation in proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 30:2216-2221.
38. Giannoudis PV, van Griensven M, Tsiridis E, Pape HC. 2007. The genetic predisposition to adverse outcome after trauma. *J Bone Joint Surg Br* 89:1273-1279.
39. Wen AQ, Wang J, Feng K, Zhu PF, Wang ZG, Jiang JX. 2006. Effects of haplotypes in the interleukin 1 beta promoter on lipopolysacchride-induced interleukin 1 beta expression. *Shock* 26:25-30.

40.Hildebrand F, Pape HC, van Griensven M, Meier S, Hasenkamp S, Krettek C, Stuhmann M. 2005. Genetic predisposition for a compromised immune system after multiple trauma. *Shock* 24:518-522.

41.Russo TA, Marr CM. 2019. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Microbiology Reviews* 32: 1-19.

42.Xu M, Fu Y, Kong H, Chen X, Chen Y, Li L, Yang Q. 2018. Bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of blaKPC, virulence factors and their impacts on clinical outcome. *BMC Infectious Diseases* 18: 1-9.

