

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

***Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2 no Brasil: epidemiologia genômica de clones
de alto risco**

Bruna Fuga Araújo

Uberlândia - MG

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

***Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2 no Brasil: epidemiologia genômica de clones de alto risco**

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

Bruna Fuga Araújo
Orientadora: Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Pinto Gontijo-Filho

Uberlândia - MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A659k Araújo, Bruna Fuga, 1991-
2019 *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2 no Brasil [recurso eletrônico] : epidemiologia genômica de clones de alto risco / Bruna Fuga Araújo. - 2019.

Orientador: Rosineide Marques Ribas.

Coorientador: Paulo Pinto Gontijo-Filho.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1505>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. *Klebsiella pneumoniae*. 3. Biofilme. 4. Genomas de Plastídeos. 5. Epidemiologia. I. Ribas, Rosineide Marques, 1974-(orient.). II. Gontijo-Filho, Paulo Pinto (coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Bruna Fuga Araújo

“Klebsiella pneumoniae produtora de KPC-2 no Brasil: epidemiologia genômica de clones de alto risco”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 25 de abril de 2019.

Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman (USP)
(USP)

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz
(UFJF)

Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho
(ICBIM-UFU)

Prof. Dr. Carlos Henrique G. Martins
(ICBIM-UFU)

Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas - orientadora
(ICBIM-UFU)

Dedicatória

*Dedico esta conquista aos meus pais
Ivani Fuga Araújo e Luiz Carlos Araújo
Por todo esforço e confiança a mim depositada.
Meu amor, carinho e eterna gratidão a vocês.*

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

À *Deus*, que me proporcionou oportunidades incríveis e me acalentou em momentos difíceis, mostrou-me o caminho nas horas incertas e supriu minhas necessidades.

Aos meus pais *Ivani* e *Luiz Carlos*, pela confiança, apoio, companheirismo e exemplo de determinação. Espero que esta etapa possa de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem.

Ao meu marido *Paulo Augusto R. Rosa*, pelo companheirismo, amizade, confiança, amor e apoio em todos os momentos que passamos juntos.

Aos meus *familiares* pelo apoio incondicional.

À Professora Dra. *Rosineide Marques Ribas*, agradeço o privilégio da sua orientação, sua contribuição para o meu desenvolvimento, por sua confiança, disponibilidade, dedicação e exemplo. Minha eterna gratidão!

Ao Professor Dr. *Paulo P. Gontijo Filho*, por sua coorientação e valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho. Muito obrigada por todo incentivo, paciência e confiança.

Aos queridos *amigos*, especialmente, *Deivid, Iara, Luiz Gustavo, Melina, Paola, Sabrina, Vinícius*, pela companhia, apoio, carinho, e toda alegria vivenciada, com vocês os dias difíceis se tornaram mais doces e os caminhos menos árduos.

Às Técnicas do Laboratório de Microbiologia Molecular (UFU) *Cristiane* e *Lícia*, que auxiliaram para além de apoio técnico, com carinho e atenção para que fosse possível a execução do trabalho no laboratório.

Ao Prof. Dr. *Jonny Yokosawa* e a técnica *Thelma F. M. S. Oliveira* do Laboratório de

Virologia (UFU), e a Profa. Dra. **Daise Aparecida Rossi** do Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (UFU), pela disponibilidade e suporte técnico.

Ao Laboratório de Genética (UFU) e Laboratório de Nanobiotecnologia (UFU), por todo apoio e infraestrutura para realização do estudo.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade Engenharia Química (UFU), particularmente ao Dr. **Rafael Heilbuth** pelas análises de MEV.

À doutora **Rebecca Tavares** do Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (UFU), por todo apoio e orientação na técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real.

Ao Prof. Dr. **Nilton Lincopan** e Dra. **Louise Teixeira Cerdeira** da Universidade Federal de São Paulo (USP), pela parceria com o Laboratório de Microbiologia Molecular, pelo suporte técnico e por todo conhecimento transmitido para realização desse trabalho.

Aos professores e colaboradores Dr. **Afonso Luiz Barth**, Dra. **Silvia Dias de Oliveira**, Dra. **Maria Márcia Camargo de Moraes**, Dra. **Lílian Alves Rocha**, Dra. **Maria Cristina Bronhro Tognim**, Dra. **Marise Dutra Asensi**, Dra. **Maria Celeste Nunes Melo**, Dra. **Albalúcia Maria C. Carvalho**, Dra. **Iolanda Alves Braga**, Dr. **Nilton Lincopan**, pela gentileza em ceder cepas utilizadas neste trabalho.

Aos professores Dr. **Jonny Yokosawa**, Dr. **Sydnei Magno da Silva** e Dra. **Helisângela de Almeida Silva** (UFU), pela disposição em participar na banca de qualificação deste trabalho e pelas valiosas contribuições apresentadas.

Aos membros da banca de defesa do doutorado, Dra. **Rosineide Marques Ribas** (UFU), Dr. **Paulo P. Gontijo-Filho** (UFU), Dr. **Carlos Henrique Gomes Martins** (UFU), Dr. **Nilton Lincopan** (USP), Dr. **Cláudio Galuppo Diniz** (UFJF), Dra. **Sabrina Royer** (UFU) e Dra. **Rebecca Tavares e Silva Brígido** (UFU), pela disponibilidade e contribuições que darão ao trabalho.

Às secretárias da coordenação do PPIPA, *Lucélia* e *Lucileide*, pela atenção e auxílio.

Aos profissionais de saúde do *Hospital de Clínicas* e a equipe do Laboratório de Microbiologia do HC-UFU por toda ajuda prestada.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), pela concessão de uma bolsa de estudos com a qual foi possível dedicação exclusiva ao doutorado.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais* (FAPEMIG), pelo suporte financeiro nas pesquisas frente ao nosso laboratório.

A todos que torceram e que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho se concretizasse, o meu sincero agradecimento.

Muito obrigada!

RESUMO

A preocupação com a rápida emergência e disseminação do gene *bla*_{KPC-2} é crescente no Brasil e no mundo pois, cepas produtoras de KPC são resistentes a maioria das classes de antimicrobianos. Desta maneira, as opções terapêuticas clinicamente disponíveis para o tratamento destas infecções são limitadas, resultando em altas taxas de mortalidade. A epidemiologia e o controle das infecções causadas por bactérias que disseminam genes de resistência aos carbapenêmicos podem ser favorecidas pela análise de genomas a partir do sequenciamento de nova geração. Assim, este trabalho utilizou essa e outras ferramentas para tentar elucidar alguns aspectos da virulência, produção de biofilmes, multirresistência e elementos genéticos móveis de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) no Brasil. Os resultados obtidos foram assustadores, uma vez que foi possível identificar um resistoma extremamente complexo em cepas de *K. pneumoniae* produtora de KPC pertencentes a clones de alto risco (CG258), também produtoras de biofilmes (90,9%), hipermucoviscosas e altamente virulentas, complicando ainda mais o tratamento clínico. Os resultados são ainda mais significativos considerando a descrição de uma nova variante do Tn4401 (Tn4401i) e de um plasmídeo IncX3 atípico (12.757 pb) em uma linhagem de alto risco de *K. pneumoniae* ST11/CG258, carreando o gene *bla*_{KPC-2} em um elemento genético não-Tn4401 (NTE_{KPC}-Ic). Aspecto ainda mais negativo foi observar que essas linhagens apresentaram alta frequência (70%) de genes *bla*_{CTX-M} coexistindo com o gene *bla*_{KPC-2}. Os dados contribuem “a priori” com o entendimento de aspectos genéticos de adaptação, resistência e virulência de clones endêmicos produtores de KPC-2. Este estudo torna-se fundamental para que, em um futuro próximo, novas estratégias possam ser formuladas e implementadas a fim de controlar a expansão de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 no Brasil.

Palavras-chave: Multirresistência, CG258, Brasil, Biofilme, KPC-2, *Klebsiella pneumoniae*, Hipermucoviscosidade, Virulência, Tn4401, NTE_{KPC}, Integron de classe 1, Plasmídeo pequeno, IncX3.

ABSTRACT

Concern with the rapid emergence and spread of the *bla*_{KPC-2} gene is increasing in Brazil and worldwide, as KPC-producing strains are resistant to most classes of antimicrobials. In this way, the clinically available therapeutic options for the treatment of these infections are limited, resulting in high mortality rates. The epidemiology and control of infections caused by bacteria that disseminate carbapenem resistance genes may be favored by genomic analysis from next-generation sequencing. Thus, this work has used this and other tool to try to elucidate some aspects of virulence, biofilm production, multiresistance and mobile genetic elements in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. The results obtained were frightening, since it was possible to identify a very complex resistome in KPC-producing *K. pneumoniae* strains belonging to high-risk clones (CG258), also producing biofilms (90.9%), extremely hypermucoviscous and highly virulent, further complicating clinical treatment. The results are even more significant considering the description of a new variant of Tn4401 (Tn4401i) and an atypical IncX3 plasmid (12.757 bp) in a high-risk lineage of *K. pneumoniae* ST11/CG258, carrying the *bla*_{KPC-2} gene into an element non-Tn4401 (NTE_{KPC}-Ic). Further negative aspect was observed that these lineages present high frequency (70%) of *bla*_{CTX-M} genes coexisting with the gene *bla*_{KPC-2}. The data contribute "a priori" to the understanding of genetic aspects of adaptation, resistance and virulence of endemic clones producing KPC-2. This study becomes essential so that soon, new strategies can be formulated and implemented to control the expansion of KPC-2-producing *K. pneumoniae* in Brazil.

Keywords: Multidrug resistance, CG258, Brazil, Biofilm, KPC-2, *Klebsiella pneumoniae*, Hypermucoviscosity, Virulence, Tn4401, NTE_{KPC}, Class 1 Integron, Small Plasmid, IncX3.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<	Menor
>	Maior
≤	Maior ou igual
≥	Menor ou igual
°C	Graus Celsius
μg	Microgramas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> ; Coleção de Cultura do Tipo Americana
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ; Ferramenta de Alinhamento de Busca Local
CG	Grupo/Complexo Clonal
CGE	<i>Center for Genomic Epidemiology</i> ; Centro de Epidemiologia Genômica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i> ; Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
Contigs	Sequências contíguas
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> ; Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ; Ácido etileno-diamino tetracético
ESBL	<i>Extended-spectrum β-lactamase</i> ; β-lactamases de amplo espectro
et al	E colaboradores
F	<i>Forward</i>
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
Hm	<i>Hypermucoviscous</i> ; Hipermucoviscosa
Hv	<i>Hypervirulent</i> ; Hipervirulenta
IMP	Imipenem
Inc	<i>Incompatibility group</i> ; Grupo de incompatibilidade
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
IS	<i>Insertion Sequence</i> ; sequência de inserção

KPC-KP	KPC-2-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de carbapenemases do tipo KPC-2
LPS	Lipopolissacarídeo
MβL	Metalo-β-lactamase
MDR	<i>Multidrug-Resistant</i> , Multirresistente
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MH	<i>Mueller-Hinton</i>
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i> , Concentração inibitória mínima
mL	Mililitro
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i> ; Tipagem por sequenciamento de multilocus
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MYSTIC	<i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection</i> ; Coleção de Informações de teste de susceptibilidade anuais a meropenem
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> ; Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NDM	<i>New Delhi MBL</i>
NGS	<i>Next-generation sequencing</i> ; Sequenciamento de nova geração
NTE_{KPC}	<i>Non-Tn4401 genetic element</i> ; Elemento genético não-Tn4401
ORF	<i>Open reading frame</i> ; Quadro aberto de leitura
OXA	Oxacilinasas
<i>p</i>	Valor de <i>p</i>
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> ; Tampão fosfato-salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> ; Eletroforese em gel de campo pulsado
PMQR	Resistência às quinolonas mediada por plasmídeos
R	<i>Reverse</i>
SD	<i>Standard Deviation</i> ; Desvio Padrão
SENTRY	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i> ; Programa de vigilância antimicrobiana
SLV	<i>Single Locus Variant</i> ; Variantes de loco único
STs	<i>Sequence Types</i> ; Tipos de Sequências
TBE	<i>Tris, Borate and EDTA</i> ; Tris, Ácido bórico e EDTA

TE	Tris e EDTA
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i> ; Ágar Triptona de Soja
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> ; Caldo Triptona de Soja
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia/mililitro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
WGS	<i>Whole-genome sequencing</i> ; Sequenciamento do genoma completo
WHO	<i>World Health Organization</i> ; Organização Mundial de Saúde
β	Beta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Representação esquemática do transposon Tn4401b.....	33
Figura 1.2. Representação esquemática da estrutura de um integron de classe 1	35
Figura 2.1. Evaluation of the number of adhered cells, biomass and biofilm formation in <i>K. pneumoniae</i> strains	98
Figura 3.1. Structural variation in Tn4401b transposon (GenBank accession number KX276209) and the novel variant (Tn4401i) (GenBank accession number MH047294), showing a 203-bp deletion between ISKpn7 and <i>bla</i> _{KPC-2} gene.....	108
Figura 4.1. Representation of the gene cassettes embedded in class 1 integrons in KPC-2-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> clones belonging to different STs, from different years..	120
Figura 4.2. Dendrogram based on similarity by PFGE patterns from 21 representative <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates	121
Figura 4.3. Decision Letter.....	121
Figura 5.1. Comparison of a small IncX3 plasmid carrying the <i>bla</i> _{KPC-2} gene into a non-Tn4401 genetic element (NTE _{KPC} -Ic) with IncX3 pEc2A plasmid (74,852-bp size) from <i>Escherichia coli</i> , IncU pD51700990 (32,424-bp size) from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , IncX3/IncU pKP1194a (45,674-bp size) from <i>Klebsiella pneumoniae</i> , IncX3-IncU pKP89 (45,575-bp size) from <i>Klebsiella pneumoniae</i> and IncX3-IncU pMTY16641 (46,380-bp size) from <i>Klebsiella pneumoniae</i>	133
Figura 5.1.2. Circular small IncX3 plasmid carrying the <i>bla</i> _{KPC-2} , displaying the absence of conjugative genes.....	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. KPC-2-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains used in the study of adhesion and biofilm formation	99
Tabela 1.2. Primer nucleotide sequences and amplicon size of the pcr carried out for the detection of antimicrobial resistance gene in this study	100
Tabela 2.1. Genome features of CTX-M-15 and KPC-2-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates	109
Tabela 3.1. Relation of resistance genes with sequence type in KPC-2-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates analyzed by whole-genome sequencing	122

SUMÁRIO

Apresentação	18
Capítulo I [Fundamentação teórica]	21
1. Infecção relacionada à assistência à saúde	22
2. Multirresistência e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
3. Resistência aos β -lactâmicos	27
3.1. β -lactamases de espectro estendido	28
3.2. Carbapenemases	29
4. Mobilização de genes de resistência	31
5. Disseminação de clones de alto risco	37
6. Virulência	38
7. Biofilme	41
8. Epidemiologia molecular na prevenção e controle de IRAS	42
9. Referências	46
Capítulo II [Hypervirulence and biofilm production in KPC-2-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> CG258 isolated in Brazil]	86
1. Abstract	88
2. Introduction, methods, results and discussion	89
3. Acknowledgements	94
4. References	95
5. Figure legends	98
6. Figure	99
7. Tables	100
Capítulo III [Insights into a novel Tn4401 deletion (Tn4401i) in a multidrug-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> clinical strain belonging to the high-risk clonal group 258 producing KPC-2]	102
1. Introduction, methods, results and discussion	104
2. Acknowledgements	106
3. References	107
4. Figure legends	108
5. Figure	109
6. Table	110
Capítulo IV [Molecular detection of class 1 integron-associated gene cassettes in KPC-2-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> clones by whole-genome sequencing]	111
1. Abstract	113
2. Introduction, methods, results and discussion	114
3. Acknowledgements	118
4. References	119
5. Figure legends	121
6. Figures	121
7. Tables	123

Capítulo V [An atypical small IncX3 plasmid carrying <i>bla</i>_{KPC-2} gene in high-risk lineage of pandrug-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST11/CG258]	125
1. Abstract	127
2. Introduction, methods, results and discussion	128
3. Acknowledgements	131
4. References	132
5. Figure legends	133
6. Figure	134
Capítulo VI [Considerações finais]	135
Capítulo VII [Apêndice]	138
1. Organograma representativo dos testes realizados nas amostras de <i>K. pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos	139

Apresentação

A alta ocorrência de microrganismos de circulação hospitalar multirresistentes é considerada um problema de saúde global, atraindo a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais. Embora a presença e a transmissão desses microrganismos sejam documentadas mais frequentemente nas últimas décadas, em países de baixa e média renda, como o Brasil, o problema é ainda mais significativo devido à documentação científica insuficiente aliada à imperfeição da eficácia das políticas de controle existentes. Adicionalmente, os recursos financeiros são limitados e o uso pouco criterioso e excessivo de antimicrobianos associados à falta de laboratórios de microbiologia torna-se outro obstáculo importante quanto ao controle de infecções causadas por esses microrganismos multirresistentes.

A microbiota hospitalar tem sido modulada ao longo dos anos principalmente pelo uso dos antimicrobianos mais prescritos, fator que favorece o aparecimento de mecanismos de resistência cada vez mais elaborados, o que pode contribuir para a permanência e a adaptação de microrganismos no ambiente hospitalar. Os mecanismos de resistência desses microrganismos são muito diversos, e em *Klebsiella pneumoniae* destacam-se aqueles associados à resistência aos carbapenêmicos, principalmente a produção da enzima *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC). Atualmente, essa enzima encontra-se disseminada pelo mundo todo, e no Brasil tem sido amplamente documentada a endemicidade dessa espécie produtora da variante KPC-2 em clones de alto risco, particularmente aqueles do complexo clonal 258 (CG258).

Cada vez mais, para esclarecer o mecanismo responsável por essa grande adaptação de *K. pneumoniae* produtora de KPC e justificar o sucesso dessa bactéria em causar infecções relacionadas a alta mortalidade, vários pesquisadores de todo o mundo vem trabalhado com ferramentas mais modernas e precisas. Dessa forma, destaca-se a análise de clonalidade, utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de campo pulsado, e análise genômica a partir do sequenciamento de nova geração. Estudos já realizados pelo nosso grupo de investigação têm adotado essas metodologias para monitorar bactérias Gram-negativas multirresistentes de importância epidemiológica, elucidando fatores que possam contribuir para manutenção desses microrganismos em diversos ecossistemas, e fornecendo informações que podem potencializar estratégias de prevenção e controle de infecções causadas por esses patógenos.

A presente tese de Doutorado foi realizada no Laboratório de Microbiologia Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia – UFU. Embora a maioria das metodologias utilizadas nesse estudo tenham sido empregadas nesse laboratório, a equipe contou com a colaboração fundamental de outros laboratórios, com destaque para o Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (UFU), Laboratório de Virologia (UFU), Laboratório de Genética (UFU), Laboratório de Nanobiotecnologia (UFU), Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (UFU) e Laboratório de Resistência Bacteriana & Alternativas Terapêuticas (Universidade de São Paulo - USP).

Esse trabalho teve como objetivos principais: (i) avaliar a disseminação de clones de alto risco entre as linhagens de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos recuperadas de diferentes macrorregiões do Brasil (nordeste, centro-oeste, sudeste e sul); (ii) analisar a sequência completa do genoma de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (KPC) representativas do Brasil, e examinar as regiões de interesse, que incluem elementos móveis (transposons e plasmídeos), integron, ambiente genético, resistoma, viruloma, *Sequence Type* (ST) e os complexos clonais; (iii) analisar a formação de biofilme nas cepas clínicas sequenciadas através de técnicas fenotípicas; (iv) avaliar a característica de hipervirulência e hipermucoviscosidade em cepas de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos; (v) determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) ao Imipenem e Pomilixina nas cepas sequenciadas.

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

Capítulo I – Revisão Bibliográfica - Apresenta uma revisão de literatura atualizada sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos.

Capítulo II – Hypervirulence and biofilm production in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil. Artigo publicado no periódico Journal of Medical Microbiology (Fator de Impacto 2.112, Qualis CAPES B2 - Ciências Biológicas III), em 2018, apresentando resultados sobre a importante associação de KPC-2, formação de biofilme e fatores de virulência em *K. pneumoniae* do *Sequence Type* ST11, caracterizado como um clone internacional de alto risco. Adicionalmente, foi observada a capacidade dessas cepas de serem hipermucoviscosas e altamente virulentas. Todos esses fatores contribuem para o sucesso desse patógeno em causar infecções, levando à sua rápida expansão e persistência em ambientes hospitalares.

Capítulo III – Insights into a novel Tn4401 deletion (Tn4401i) in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical strain belonging to the high-risk clonal group 258 producing KPC-2. Artigo publicado no periódico International Journal of Antimicrobial Agents (Fator de Impacto 4.253, Qualis CAPES A2 - Ciências Biológicas III), em 2018, com descrição de uma nova variante do transposon Tn4401 encontrado em um clone de alto risco de *K. pneumoniae* produtora da enzima KPC-2. O estudo mostrou que esse transposon pode desempenhar um papel fundamental na disseminação do gene *bla*_{KPC-2} entre microrganismos clinicamente significativos selecionados a partir de ambientes com consumo intenso de antimicrobianos.

Capítulo IV – Molecular detection of class 1 integron-associated gene cassettes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* clones by whole-genome sequencing. Artigo aceito para publicação no periódico Microbial Drug Resistance (Fator de Impacto 2.344, Qualis CAPES B1 - Ciências Biológicas III), em 2019, apresentando resistoma complexo de clones de alto risco de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 em hospitais brasileiros e os cassetes gênicos associados a um dos elementos genéticos mais disseminados nesse microrganismo, o integron de classe 1.

Capítulo V – An atypical small IncX3 plasmid carrying *bla*_{KPC-2} gene in high-risk lineage of pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11/CG258. Artigo submetido para publicação no periódico International Journal of Antimicrobial Agents (Fator de Impacto 4.253, Qualis CAPES A2 - Ciências Biológicas III), em 2019, apresentando a descoberta de um novo plasmídeo pequeno atípico IncX3, de 12.757 pb, em um clone de alto risco de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 no Brasil, relacionado geneticamente a um plasmídeo híbrido IncX3-IncU, também descrito neste trabalho. Os achados do estudo contribuem para uma melhor compreensão do fenômeno de adaptação de plasmídeos pequenos, tanto relacionado aos níveis de resistência a antimicrobianos, quanto ao custo de *fitness*. Tais fatores podem determinar o sucesso da persistência de bactérias carregando plasmídeos pequenos durante e após o tratamento com antimicrobianos.

Capítulo VI – Considerações finais. Principais conquistas obtidas com o estudo, contribuições e aplicabilidade dos resultados da pesquisa.

Capítulo I

Fundamentação teórica

1. Infecção relacionada à assistência à saúde

Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são reconhecidas como grave risco para pacientes em todo o mundo (WHO, 2010), permanecendo como o evento adverso mais frequentemente relacionado aos cuidados de saúde (CARDOSO et al., 2014). Esse problema é ainda mais grave nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (RICHARDS et al., 2000; ALBERTI et al., 2002; VINCENT et al., 2009), aumentando a morbidade, mortalidade e os custos hospitalares (VINCENT et al., 2009; NANGINO, et al., 2012). Apesar disso, as IRAS não têm recebido atenção compatível com seu impacto sobre a saúde coletiva (YALCIN, 2003; PITTET et al., 2008; PADOVEZE et al., 2010; NOGUEIRA JUNIOR, et al., 2014; PADOVEZE; FORTALEZA, 2014), visto que em países desenvolvidos, estima-se que as IRAS afetam mais de 50% de pacientes hospitalizados em unidades críticas, e em outras enfermarias as frequências podem atingir 5 a 15% (NEJAD et al., 2011; SCHERBAUM et al., 2014).

Já em países de baixa e média renda, como o Brasil, os hospitais ainda albergam a maior parte das intervenções terapêuticas de média e alta complexidade, e os estudos indicam que as taxas de IRAS podem ser até 20 vezes superior aos países desenvolvidos (WHO, 2007; PITTET et al., 2008; PADOVEZE; FORTALEZA, 2014). Esse cenário pode ser explicado por fatores associados à escassez de qualificação de recursos humanos, aliados a uma estrutura física inadequada em serviços de saúde e a precariedade de medidas de controle de IRAS, todos os quais fazem da prevenção e controle de infecções um desafio (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014).

Estudos de vigilância nacionais ou multicêntricos estão disponíveis em poucos países com poucos recursos financeiros (ALLEGIANZI et al., 2011, ALP; DAMANI, 2015; ROSENTHAL et al., 2006). Na América Latina, dados do SENTRY (*SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*), um programa de vigilância de resistência a antimicrobianos, tem mostrado variações nas taxas de IRAS causadas por microrganismos resistentes ao longo do tempo (GALES et al., 2012). No Brasil, poucos trabalhos multicêntricos são dignos de serem mencionados no que se refere ao controle e prevenção de IRAS, com destaque para o estudo de Prade et al. (1995), Starling; Couto; Pinheiro (1997), Rosenthal et al. (2010), Padoveze et al. (2010), Fortaleza et al. (2017) e Braga et al. (2018).

O projeto IRAS-Brasil, que teve como objetivo identificar a carga de IRAS e os recursos para controle de infecção em hospitais brasileiros descreveu a prevalência de IRAS no

período de 2011-2013, envolvendo hospitais de diferentes complexidades de 10 estados localizados nas cinco macrorregiões do Brasil, compreendendo 152 hospitais (FORTALEZA et al., 2017). A prevalência geral de IRAS foi de 10,8%, sendo que a região norte do Brasil apresentou maior predomínio (12,2%) de pacientes com IRAS, seguido pela região centro-oeste (11,3%), região sudeste (10,2), nordeste (9,3%) e sul (8,3%) (FORTALEZA et al., 2017). Em relação ao tipo de infecção, a pneumonia foi a mais frequente (3,6%), seguida por infecções de corrente sanguínea (2,9%), infecções do sítio cirúrgico (1,5%) e infecções do trato urinário (1,4%), sendo que a maior frequência das síndromes infecciosas foi encontrada em recém-nascidos, lactantes e idosos (FORTALEZA et al., 2017).

Já o estudo multi-hospitalar realizado em 28 UTIs localizadas no estado de Minas Gerais no Brasil, mostrou prevalência superior de IRAS (51,2%) comparada com EUA (6,1%) e Europa (48,4%), mas semelhantes a outros estudos brasileiros (RICHARDS, et al., 2000; ALBERTI, et al., 2002; LISBOA, et al., 2007; VINCENT, et al., 2009; SILVA, et al., 2012; BRAGA et al., 2018). Esta investigação também revelou que pneumonia foi tipo de infecção mais frequente, seguido por infecções da corrente sanguínea e infecções do trato urinário, que juntas representaram 90,8% de todas as infecções nosocomiais (BRAGA et al., 2018).

É notório que pode haver variações nas taxas e distribuições de infecções entre estudos multicêntricos, contudo todos esses trabalhos relataram que as IRAS são altamente prevalentes, apresentando um desafio para as autoridades públicas (FORTALEZA et al., 2017; BRAGA, 2018). A nível global, essas infecções requerem cuidado especial devido a emergência de microrganismos que expressam resistência a uma ampla variedade de antimicrobianos (CORNEJO-JUÁREZ et al., 2015).

2. *Multirresistência e *Klebsiella pneumoniae**

A emergência e disseminação de bactérias multirresistentes passaram a ser um problema de saúde pública globalizado, particularmente em países em desenvolvimento como o Brasil, consequência direta do uso abusivo e irracional de antimicrobianos, elevando significativamente a mortalidade, a morbidade e os custos, bem com limitando consideravelmente as opções terapêuticas (BERENDONK et al., 2015; GONTIJO-FILHO et al., 2016; von WINTERSDORFF et al., 2016). Esse cenário é ainda mais ameaçador considerando que bactérias estão se disseminando entre animais e humanos, bem como entre os diferentes ecossistemas (von WINTERSDORFF et al., 2016; MADEC et al., 2017). Nesse

contexto, o Brasil tem sido amplamente afetado, fato que tem sido refletido em diversas publicações nacionais e internacionais, em que bactérias Gram-negativas, codificando novos e abrangentes mecanismos de resistência, têm sido associadas não apenas com infecções graves e surtos, mas também detectadas em animais e ambientes não hospitalares (ROSSI et al., 2016; FERNANDES et al., 2016; FERNANDES et al., 2017; SELLERA et al., 2017; BRAGA et al., 2018)

No âmbito epidemiológico, as infecções causadas por bactérias multirresistentes (não suscetível a um ou mais agente antimicrobiano em três ou mais categorias de antimicrobianos) (MAGIORAKOS et al., 2012) estão relacionadas a diversos fatores de risco, que inclui o uso prévio de antimicrobianos, comorbidades (ex., Diabetes *mellitus*), procedimentos invasivos (ex., ventilação mecânica, cateter venoso central e cateter urinário), tempo de hospitalização prolongado (tempo de hospitalização igual ou superior a 45 dias), e outros (ENGEL, 2009; ARAÚJO et al., 2016; PATOLIA et al., 2018). Entre esses fatores, a literatura tem dado destaque ao uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos (GAYNES, 1997; WHITE et al., 2000; PATRICK et al., 2004; TANGCHAROENSATHIEN et al., 2018), e no Brasil, esse problema fica ainda mais evidente, em que a prescrição de determinados antimicrobianos em unidades críticas de hospitais é muito maior do que em países da Europa e América do Norte (MEYER et al., 2003; NISS et al., 2004; MOREIRA et al., 2013; PORTO et al., 2013; DANTAS et al., 2017).

Estudos importantes têm sido realizados na região sudeste do Brasil, evidenciando o consumo de antimicrobianos nos hospitais (MOREIRA et al., 2013; ROSSI et al., 2016; DANTAS et al., 2017; BRAGA, 2019). Dados de Braga (2019) demonstraram altas taxas de uso de antimicrobianos (62,0%) em 35 unidades de terapia intensiva localizadas em Minas Gerais. Observou-se nessa investigação que o uso terapêutico mais frequente de antimicrobianos foi para o tratamento de pneumonia (63,4%) e infecção da corrente sanguínea (30,2%). O uso empírico de antimicrobianos foi extremamente elevado nesses pacientes (60,3%). Em particular, essa pesquisa revelou o uso regular de carbapenêmicos, e um alto consumo de antimicrobianos de amplo espectro, principalmente de cefalosporinas, mais frequentes em hospitais não universitários (64,4%) e de polimixinas, mais frequente em hospitais universitários (65,0%).

Em Uberlândia - MG, Moreira e colaboradores (2013), documentaram o uso elevado de antimicrobianos na UTI de adultos, no período de maio a agosto de 2010, principalmente

cefalosporinas de amplo espectro, com aumento significativo no consumo de glicopeptídeos e carbapenêmicos. Da mesma maneira, o estudo de Dantas et al. (2017), realizado em todas as enfermarias do hospital, entre maio de 2009 a dezembro de 2012, reportou alto consumo de antimicrobianos, particularmente ceftriaxona, cefepima e meropenem. Recentemente, o consumo intenso de polimixina foi impressionante, considerando que há pouco tempo o seu uso era restrito, esse fato foi evidenciado no estudo de Rossi e colaboradores (2016), durante o desenvolvimento e descrição de um surto de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2 em uma unidade crítica de um hospital de grande porte no Brasil. Desse modo, o alto consumo de antimicrobianos tem sido relacionado à maior incidência de bactérias multirresistentes, podendo exercer papel fundamental na pressão seletiva exercida por esses medicamentos (KARAN et al., 2016; ZAMAN et al., 2017).

Muitos microrganismos resistentes aos antimicrobianos, com destaque para o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) entre os cocos Gram-positivos e *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos entre os bacilos Gram-negativos, representam uma alerta de risco significativo para o desenvolvimento de infecção, principalmente entre pacientes críticos (TRILLA, 1994; HERNÁNDEZ et al., 2004; ALLEN, 2005; DHILLON, CLARK, 2009). Neste contexto, nos últimos anos, observa-se o aumento importante da incidência de IRAS causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes, com destaque para *K. pneumoniae*, o que passou a ser um problema global, consequência da habilidade desses microrganismos em desenvolver resistência a quase todos antimicrobianos disponíveis para tratamento, quer seja pela seleção de cepas com mutações em genes cromossômicos ou pela transferência horizontal de genes (GOOTZ, 2010; TANWAR, 2014; HOU, 2015).

K. pneumoniae é considerada um patógeno versátil responsável por infecções nosocomiais com altas taxas de mortalidade em pacientes criticamente doentes, podendo estar associada a terapia antimicrobiana inadequada (CHEN et al., 2013; MARTIN; BACHMAN, 2018). Além disso, esse microrganismo também é responsável por um número significativo de infecções adquiridas na comunidade em todo o mundo (KO et al., 2002; BENGOCHEA; PESSOA, 2018).

No ambiente hospitalar, a prevalência desse microrganismo tem sido também fortemente documentada, como demonstrado no estudo SENTRY realizado na América Latina, durante o período de 2008 a 2010, no qual a *K. pneumoniae* esteve entre os principais agentes Gram-

negativos em infecções de corrente sanguínea (12,3%), precedida apenas por *Escherichia coli* (19%). Em se tratando de pneumonia e infecções da pele e tecidos moles, *K. pneumoniae* foi o quarto agente etiológico mais detectado (10,2% e 10,4%, respectivamente) (GALES et al., 2012). No Brasil, esse estudo também reportou altas taxas de resistência entre *Klebsiella* spp., principalmente susceptibilidade reduzida ao azetronam (46,4%), cefuroxima (52,3%), ceftriaxona (52,5%), ceftazidima (40%), cefepime (36,3%), ciprofloxacina (41,3%) e tobramicina (40,8%) (GALES et al., 2012).

Outro estudo de vigilância antimicrobiana, MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*), realizado em unidades críticas do Brasil, documentou que de 1.550 bactérias Gram-negativas coletadas de vinte centros hospitalares, *K. pneumoniae* (16,9%) foi o terceiro patógeno mais prevalente depois de *P. aeruginosa* (30,3%) e *E. coli* (18,6%) (KIFFER et al., 2005). Já em Minas Gerais, região sudeste do Brasil, um estudo realizado em 28 UTIs clínico-cirúrgicas mostrou que de 119 microrganismos avaliados como causadores de infecções hospitalares, 52,9% foram Gram-negativos com predomínio de *P. aeruginosa* (27%), *A. baumannii* (27%), *E. coli* (19%) e *Klebsiella* spp. (12,6%) (BRAGA et al., 2018). Esses microrganismos Gram-negativos se sobressaíram também em relação à resistência aos antimicrobianos (63%), comparados aos Gram-positivos (37%), em que *Klebsiella* spp. foi um dos microrganismos com maiores taxas de resistência (17,7%) entre os Gram-negativos (BRAGA et al., 2018). A importância desse patógeno foi também evidenciada em Uberlândia, com a descrição de um dos maiores surtos em unidade crítica no Brasil, apontando que pacientes infectados por *K. pneumoniae* produtora de KPC resistente a colistina foram mais propensos a ter infecção e apresentaram taxa de mortalidade mais alta (ROSSI et al., 2016).

Como mencionado, *K. pneumoniae* tem ganhado notoriedade entre os microrganismos multirresistentes causadores de IRAS não apenas devido a sua associação com infecções graves, mas também por estar relacionada a escassez de tratamentos eficazes (PACZOSA; MECSAS, 2016). Embora muitos aspectos microbiológicos, clínicos e epidemiológicos de *K. pneumoniae* multirresistentes tenham sido elucidados (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017; MARTIN; BACHMAN, 2018), permanecem lacunas sobre reservatórios ambientais de genes de resistência desses organismos (DAVIES; DAVIES, 2010; MANGES, 2015).

Os mecanismos de resistência de *K. pneumoniae* apresentando o fenótipo de multirresistência ou extensivamente resistente são muito diversificados, e incluem: inativação/alteração da droga, alteração do sítio ativo, hiperexpressão de bombas de efluxo, sistema de modificação de lipopolissacarídeo (LPS) e perda de porina (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017). Esses mecanismos estão associados com elementos genéticos móveis ou não, tais como integrons, transposons e plasmídeos, que podem facilitar a captura, acumulação e disseminação de genes de resistência (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017). Assim, esses mecanismos exclusivos ou combinados, somados a escassez de antimicrobianos disponíveis no momento, e a importância epidemiológica de algumas linhagens de *K. pneumoniae*, tornaram esses microrganismos um grande desafio não apenas no ambiente hospitalar (MUNOZ-PRICE et al., 2013; NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017).

3. Resistência aos β -lactâmicos

Os β -lactâmicos (ex., penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos) estão entre os antimicrobianos mais clinicamente prescritos (HUTTNER et al., 2015; EIAMPHUNGORN et al., 2018). Entre os bacilos Gram-negativos a resistência aos β -lactâmicos é mediada principalmente pela produção de enzimas, denominadas β -lactamases (BUSH, 2010; BONOMO, 2017; BUSH, 2018), que atuam catalisando a hidrólise do anel β -lactâmico, inativando, assim, a ação de vários antimicrobianos pertencentes a esse grupo (ABRAHAM; CHAIN, 1940; KONG; SCHNEPER; MATHEE, 2010; BONOMO, 2017; BUSH, 2018).

Diferentes critérios são utilizados para classificar as β -lactamases, contudo as classificações mais difundidas são baseadas na estrutura molecular, proposta por Ambler (1980) e, nas características enzimáticas, propostas por Bush, Jacob e Medeiros (1995).

De acordo com a classificação de Ambler (1980), as β -lactamases foram divididas em classes moleculares (A, B, C e D), conforme a estrutura molecular da proteína (enzima). Enzimas pertencentes às classes A, C e D, são denominadas serina- β -lactamases, as quais possuem um aminoácido serina no centro ativo da enzima. Já aquelas pertencentes à classe B, nomeadas como metalo- β -lactamases (MBL), são enzimas dependentes de zinco (Zn^{+2}), como cofator para a atividade enzimática. Por outro lado, Bush, Jacob e Medeiros (1995) estabeleceram diferentes grupos de β -lactamases (grupos de 1 a 4, com subdivisões), de

acordo com o substrato da enzima e o perfil de inibição por inibidores de β -lactamases.

3.1. β -lactamases de espectro estendido

β -lactamases de espectro estendido (ESBL) são enzimas capazes de hidrolisar penicilina, cefalosporinas (terceira e quarta geração) e monobactâmico (ex., aztreonam), podendo ser inativadas por inibidores específicos (ex., ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) (RAHMAN et al., 2018; BUSH, 2018). São identificadas em vários membros da família Enterobacteriaceae e em alguns bacilos Gram-negativos não-fermentadores, contudo os principais microrganismos produtores de ESBL são *K. pneumoniae* e *E. coli* (PITOUT et al., 2005). *K. pneumoniae* produtora de ESBL estão frequentemente envolvidas em infecções relacionadas à assistência à saúde em UTIs (LAURENT et al., 2008; HENDRIK; VOOR IN 'T HOLT; VOS, 2015), e na América do Sul, especialmente no Brasil, a ESBL predominante pertence à família CTX-M (CHAGAS et al., 2011; ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2015).

A disseminação mundial de genes que codificam enzimas do tipo CTX-M é considerada um dos fenômenos mais rápidos e bem-sucedidos de resistência microbiana na era dos antimicrobianos (CANTÓN et al., 2012; D'ANDREA et al., 2013), no qual já foram identificadas mais de 200 variantes em todo mundo (BUCKNER; CIUSA; PIDDOCK, 2018). As variantes de CTX-M podem ser divididas em cinco grupos de acordo com similaridades nas suas sequências de aminoácidos: CTX-M-1 (ex., *bla*_{CTX-M-15}), CTXM-2 (ex., *bla*_{CTX-M-2}), CTX-M-8 (ex., *bla*_{CTX-M-8}), CTX-M-9 (ex., *bla*_{CTX-M-14}) e CTX-M-25 (PITOUT; LAUPLAND, 2008; PEIRANO; PITOUT, 2010). Mundialmente, CTX-M-15 e CTX-M-14 são os genótipos predominantes (BEVAN et al., 2017), contudo, no Brasil, há um predomínio de CTX-M-2 e CTX-M-15 (ROCHA et al., 2016). Epidemiologicamente estima-se que aproximadamente 50% das cepas de *K. pneumoniae* sejam produtoras de ESBL no Brasil (ROCHA et al., 2016), aumentando o risco de falhas terapêuticas e mortalidade, o que acaba por impactar a saúde pública mundial (PITOUT; LAUPLAND, 2008; MASLIKOWSKA et al., 2016).

Plasmídeos de diferentes grupos de incompatibilidade estão envolvidos na rápida disseminação de genes *bla*_{CTX-M} (CANTÓN et al., 2012; ROCHA et al., 2016), podendo carrear também outros genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos, carbapenêmicos e fluoroquinolonas (CANTÓN et al., 2012), contribuindo para um cenário pandêmico descontrolado. Isso pode ser justificado em parte, pois essas enzimas podem coexistir com

outras β -lactamases (ex., KPC, NDM e VIM) na mesma cepas de *K. pneumoniae*, uma estratégia bacteriana comum para aumentar a resistência aos antimicrobianos (CANTÓN et al., 2012).

Vários fatores estão relacionados ao sucesso de ESBLs, como a captura e dispersão eficiente do gene *bla*_{CTX-M} por elementos genéticos móveis, a associação com clones bacterianos de alto risco e a alta pressão seletiva provocada pelo uso indiscriminado de cefalosporinas de espectro estendido e fluoroquinolonas em ambientes clínicos e veterinários (D'ANDREA et al., 2013).

Embora CTX-M tenha assumido papel relevante ao longo dos anos (BEVAN et al., 2017), outras enzimas ESBLs, como TEM e SHV, também foram associadas a importantes surtos hospitalares por *K. pneumoniae* (CANTÓN et al., 2012; PATERSON; BONOMO, 2005). Diante disso, os carbapenêmicos são utilizados como escolha terapêutica para tratamento de infecções graves por microrganismos produtores de ESBLs (TAMMA; RODRIGUEZ-BAÑO, 2017). No entanto, essa prática tem levado a seleção de cepas resistentes, produtoras de carbapenemases, como por exemplo, *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) e metalo- β -lactamases (MBL) (VAN BOXTEL et al., 2016).

3.2. Carbapenemases

Carbapenemases compõem um grupo heterogêneo de β -lactamases do qual fazem parte a classe A (penicilinases), B (metaloenzimas) e D (oxacilinases) que hidrolisam imipenem e meropenem, além de outras penicilinas e cefalosporinas (QUEENAN; BUSH, 2007; BERTONCHELI; HÖRNER, 2008; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

As carbapenemases do tipo KPC são frequentemente relatadas em *K. pneumoniae*, embora também tenha sido descrita em outros microrganismos da família Enterobacteriaceae e bacilos Gram-negativos não fermentadores, como *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (ROBLEDO et al., 2011; MUNOZ-PRICE et al., 2013; CHEN et al., 2014; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015; DAI et al., 2016). KPC pertence à classe A de Ambler e ao grupo funcional 2f de Jacoby e Medeiros (QUEENAN; BUSH, 2007; BUSH; JACOB, 2010) e confere resistência a todos β -lactâmicos ativos contra infecções causadas por *K. pneumoniae* (SHANMUGAM; MEENAKSHISUNDARAM; JAYARAMAN, 2013).

Essa enzima foi encontrada pela primeira vez em uma cepa clínica de *K. pneumoniae* na Carolina do Norte (EUA), em 1996 (YIGIT et al., 2001) e nos dias atuais encontra-se

disseminada pelo mundo todo (BEIRÃO et al., 2011; CASTANHEIRA et al., 2013; RUIZ-GARBAJOSA et al., 2013; LEE et al., 2016; van DUIN; DOI, 2017). Atualmente, mais de 20 variantes de KPC já foram relatadas mundialmente (NAAS; DORTET; IORGA, 2016; LEE et al., 2016; PALZKILL, 2018), sendo reportada de forma endêmica nos EUA, Grécia, Polônia, Itália, China, Taiwan, Israel, Colômbia, Argentina e no Brasil, e de maneira esporádica em países Europeus, da Ásia e da Oceania (LEE et al., 2016), em que as variantes do tipo KPC-2 e KPC-3 são as mais frequentemente identificadas (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

No Brasil, o primeiro relato publicado de *K. pneumoniae* produtora de KPC foi em 2009, em cepas recuperadas na cidade de Recife (MONTEIRO et al., 2009). Contudo, posteriormente outra pesquisa mostrou que essas cepas são mais antigas que o relatado, sendo descritas em São Paulo em 2005 (PAVEZ et al., 2009). Além disso, muitas publicações têm documentado a rápida disseminação e endemicidade de *K. pneumoniae* produtora de KPC em todas regiões do país, muitas vezes associadas com surtos de IRAS (ABBOUD et al., 2011; GALES et al., 2012; NAVES et al., 2011; PEREIRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2013).

Além da KPC, outras carbapenemases têm assumido importância epidemiológica, devido a sua associação com transposons, plasmídeos e integrons (PARTRIDGE et al., 2018). Dessa forma, o destaque é dado para as metalo- β -lactamases, que atualmente são classificadas como IMP (*Imipenemase*), VIM (*Verona Imipenemase*), SPM-1 (*São Paulo MBL*); GIM (*German Imipenemase*) e SIM-1 (*Seul Imipenemase*) (MENDES et al., 2006), e mais recentemente AIM-1 (*Australian Imipenemase*) (YONG et al., 2007), KHM (*Kyorin University Hospital*) (SEKIGUCHI et al., 2008), NDM-1 (*New Delhi MBL*) (YONG et al., 2009) e DIM-1 (*Dutch imipenemase*) (POIREL et al., 2010). No cenário mundial, MLBs do tipo VIM e IMP tem ganhado notoriedade (WALSH et al., 2005; DORTET et al., 2015), enquanto que no Brasil há um predomínio endêmico de SPM (RIZEK et al., 2014; CHAVES et al., 2017).

Cada vez mais esses microrganismos têm nos surpreendido em relação à produção de enzimas que conferem resistência aos antimicrobianos, o que pode ser observado com o aparecimento de uma nova metalo- β -lactamase, a “*New Delhi Metallo- β -lactamase*” (NDM) (YONG et al., 2009). O sucesso e a disseminação de clones internacionais de alto risco e plasmídeos epidêmicos tem sido detectados no Brasil podendo ter um papel crítico na rápida expansão nacional de genes codificadores de NDM (ANDRADE; DARINI, 2015). Assim, o Brasil está sob ameaça iminente de disseminação nacional e prevalência de NDM (ANDRADE; DARINI, 2015).

Além das carbapenemases citadas, outras enzimas importantes passaram a ser identificadas nesses microrganismos, como as carbapenemases do tipo oxacilinases (OXA) que incluem enzimas com capacidades hidrolíticas menores contra os carbapenêmicos, contudo não menos importante (PEREIRA et al., 2015). Em 2001, a enzima OXA-48 foi isolada pela primeira vez na Turquia em cepas de *K. pneumoniae* e atualmente é observada mundialmente (SHANTHI et al., 2013; PEREIRA et al., 2015), além de outras variantes alélicas descritas, como a OXA-181 encontrada em diversos microrganismos da família Enterobacteriaceae, especialmente *K. pneumoniae* (SHANTHI et al., 2013). E mais recentemente uma nova variante alélica, a OXA-370, foi relatada em uma cepa de *Enterobacter hormaechei* no Sul do Brasil (PEREIRA et al., 2015). A importância dessas enzimas tem sido associada ao fato desses genes serem encontrados também como cassete gênico em integrons, transposons ou associados com sequências de inserção, localizados em plasmídeos, conjugativos ou não (QUEENAN; BUSH, 2007; NOLL et al., 2018).

Comprometendo essa situação, a dificuldade no tratamento de infecções graves por bacilos Gram-negativos multirresistentes impulsionou em nível mundial a reintrodução das polimixinas (polimixina B e colistina) como última opção terapêutica (FALAGAS; KASIAKOU, 2005; LI et al., 2006; BISWAS et al., 2012; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017). No entanto, devido ao aumento do uso desses antimicrobianos já tem sido relatada resistência as polimixinas por bactérias que são normalmente susceptíveis a essas drogas (BARON et al., 2016; FERNANDES et al., 2016; FERNANDES et al., 2017; MONTE et al., 2017; SELLERA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018), bem como relatos do aumento nas infecções causadas por bactérias naturalmente resistentes a polimixinas como *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* e *Serratia marcescens* (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017). Dessa forma, estamos diante de uma grande ameaça no que se refere às infecções intratáveis (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014), e o aspecto mais assustador é a facilidade com que esses microrganismos são capazes de transferir determinantes de resistência para outras espécies bacterianas, favorecendo esse cenário (WANG et al., 2018).

4. Mobilização de genes de resistência

A dinâmica da resistência aos antimicrobianos envolve numerosos fatores que interagem e contribuem para a adaptação das populações bacterianas (MUNITA; ARIAS, 2016;

PARTRIDGE et al., 2018). No entanto, como chave para a evolução desses microrganismos, um dos principais fatores envolvidos é a capacidade das bactérias em mobilizar genes de resistência por plasmídeos, elementos conjugativos integrativos, transposons, cassetes gênicos em integrons e sequências de inserção (PARTRIDGE et al., 2018).

Plasmídeos que conferem resistência a antimicrobianos foram inicialmente descritos em 1960 por Watanabe e Fukasawa (1960) no Japão. E posteriormente, inúmeros relatos associaram a disseminação mundial de genes de resistência aos plasmídeos (RAMIREZ et al., 2014; CARATTOLI et al., 2015; FERNANDES et al., 2016; HARDIMAN et al., 2016; SUN et al., 2018). Uma das maneiras de identificar e classificar esses plasmídeos se baseia na incompatibilidade, em que os plasmídeos pertencentes ao mesmo grupo de incompatibilidade (Inc) não podem ser propagados estavelmente em uma mesma linhagem celular (DATTA; HUGHES, 1983; COUTURIER et al., 1988; ORLEK et al., 2017).

Atualmente, o estudo da genômica tem permitido refinar a identificação desses grupos de incompatibilidade de plasmídeos, em que já foram relatados mais de 110 grupos e subgrupos de incompatibilidade com base no banco de dados de plasmídeos de Enterobacteriaceae (PlasmidFinder) (CARATTOLI et al., 2014; ZETNER et al., 2017). O interesse no estudo de plasmídeos de cepas de *K. pneumoniae* tem aumentado, visto que a literatura tem focado a atenção no seu sequenciamento (ZHAO et al., 2010; ORLEK et al., 2017), particularmente daqueles plasmídeos associados a presença de genes que codificam a produção de β -lactamases de espectro estendido do tipo CTX-M (KIM; KO, 2018; SHEN et al., 2019) e as carbapenemases (ex., KPC, IMP e NDM) (FENG et al., 2016; CERDEIRA et al., 2017; PASKOVA et al., 2018; CERDEIRA et al., 2019). Para exemplificar a diversidade desses plasmídeos em cepas de *K. pneumoniae* produtoras do gene *bla*_{KPC-2}, os principais grupos de incompatibilidade incluem: IncFII, IncFIA, IncFIB, IncN, IncX3, IncR, IncHI1, IncI, IncA/C, IncP, IncU, IncW, IncL e ColE (CHEN et al., 2014; NAVON- VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017).

A literatura tem mostrado também que esses plasmídeos estão sofrendo rearranjos, o que pode favorecer o sucesso evolutivo da cepa (HE et al., 2016; MANGAT et al., 2017). Recentemente, esse evento foi evidenciado em uma linhagem de *K. pneumoniae* recuperada de um paciente com pneumonia, em 2016 no Japão (AINODA et al., 2019). Nesse estudo, o plasmídeo carreando o gene *bla*_{KPC-2} apresentou grupo de incompatibilidade híbrido, IncX3-

IncU, bem como um conjunto de genes envolvidos na replicação, mobilização, conjugação e outros genes acessórios, semelhante a outros plasmídeos híbridos (IncX3-IncU) do Brasil (AINODA et al., 2019). Outros plasmídeos multirreplicons também tem sido documentados nesses microrganismos portadores do gene *bla*_{KPC-2}, como por exemplo plasmídeos IncR-IncFII (FENG et al., 2018).

Tais abordagens genômicas permitiram ainda revelar uma grande diversidade de plasmídeos em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (ORLEK et al., 2017). Pesquisas sobre fenômenos de adaptação bacteriana, tanto nos níveis de resistência a antimicrobianos quanto no custo de *fitness*, mostram que bactérias podem carrear plasmídeos pequenos contendo genes de resistência, e a presença desses plasmídeos pode de alguma maneira beneficiar o seu sucesso em determinado ecossistema (SAN MILLAN et al., 2015). Embora os fenômenos de adaptação não tenham sido avaliados, estudos têm mostrado exemplos importantes de plasmídeos pequenos associados à resistência aos carbapenêmicos (GALETTI et al., 2016; STOESSER et al., 2017; CERDEIRA et al., 2019). Recentemente, Cerdeira e colaboradores (2019) descreveram plasmídeos pequenos IncQ1 e Col-like (14.873 pb e 9.548 pb, respectivamente) carreando o gene *bla*_{KPC-2} em cepas clínicas de *K. pneumoniae* recuperadas em 2011 e 2015, respectivamente, no Brasil.

KPC é a carbapenemase de classe A de Ambler mais frequente, no qual o gene *bla*_{KPC} pode ser encontrado em transposons localizados em plasmídeos, garantindo a sua dispersão não só entre as espécies de *K. pneumoniae*, mas entre outros gêneros bacterianos (CUZON; NAAS; NORDMANN, 2011). O transposon Tn4401 (transposon da família Tn3) é considerado o mais importante epidemiologicamente carreando o gene *bla*_{KPC} (CUZON; NAAS; NORDMANN, 2011; CHERUVANKY et al., 2017). Esse transposon é composto por gene que codifica uma transposase (*tnpA*), uma resolvase (*tnpR*) e o gene *bla*_{KPC} flanqueado pelas sequências de inserção IS*Kpn7* (*upstream*) e IS*Kpn6* (*downstream*). Entre IS*Kpn7* e *bla*_{KPC} podem existir deleções de alguns pares de bases (pb), o que pode determinar diversas variantes desse transposon (CHERUVANKY et al., 2017) (Figura 1).

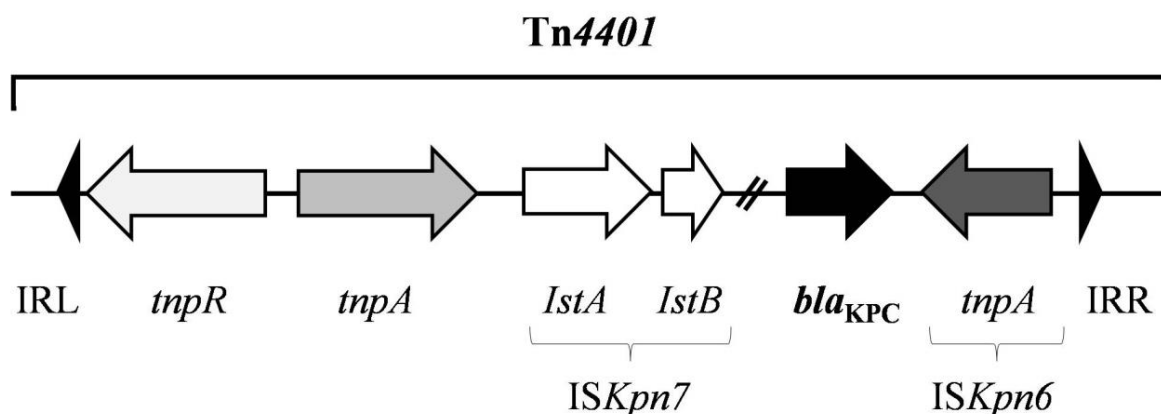


Figura 1. Representação esquemática do transposon Tn4401b. Os genes e a sua orientação de transcrição são representados por setas horizontais. O transposon é delimitado por duas sequências invertidas representadas por triângulos pretos. As setas brancas e cinza escuro, representam as sequências de inserção do ISKpn7 e ISKpn6, respectivamente. A linha dupla vertical *upstream* ao gene *bla*_{KPC} representa a zona de deleções de variantes do Tn4401 (Fonte: Adaptado de NAAS et al., 2008).

Até o presente momento, foram relatadas na literatura nove isoformas de Tn4401 (Tn4401a-Tn4401i) (CHEN et al., 2012; BRYANT et al., 2013; PECORA et al., 2015; BARANIAK et al., 2015; CHERUVANKY et al., 2017; ARAÚJO et al., 2018a), sendo o Tn4401a e Tn4401b os mais disseminados (MUNOZ-PRICE et al., 2013; CHERUVANKY et al., 2017). No Brasil, já foram encontradas as isoformas “a”, “b”, “c” e “i” (ANDRADE et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012; PEREIRA et al., 2013; RAMOS et al., 2014; PÉREZ-CHAPARRO et al., 2014; ARAÚJO et al., 2018a), no entanto, a disseminação do gene *bla*_{KPC-2} ocorre principalmente devido à dispersão do Tn4401b, como demonstrado por Pereira et al. (2013), em uma pesquisa sobre a epidemiologia molecular de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 realizada em 12 estados brasileiros, em que todas as cepas analisadas (39 cepas) apresentaram o Tn4401b, independente da região do país.

Embora, o Tn4401 seja o mais relatado em associação ao gene *bla*_{KPC} em cepas de *K. pneumoniae* (CUZON; NAAS; NORDMANN, 2011; CHERUVANKY et al., 2017), outros estudos têm demonstrado cada vez mais a frequência do elemento móvel não Tn4401 (do inglês, *non-Tn4401 elements*-NTE_{KPC}) também associado a dispersão desse gene de resistência (CERDEIRA et al., 2017; ARAÚJO et al., 2018a; DE BELDER et al., 2018; MANAGEIRO et al., 2018; CERDEIRA et al., 2019). Esses elementos NTE_{KPC} foram descritos pela primeira vez em 2006 na China (SHEN et al., 2009), e logo, foram relatados na América do Sul (Brasil e Argentina) (GOMEZ et al., 2011; CERDEIRA et al., 2017; ARAÚJO et al., 2018a; CERDEIRA et al., 2019) e na Rússia (AGEEVETS et al., 2016).

Baseado nas sequências de inserção localizadas *upstream* ao gene *bla*_{KPC}, o elemento NTE_{KPC} pode ser dividido em três grupos: NTE_{KPC}-I (ausência de inserção), NTE_{KPC}-II (inserção do gene Δ *bla*_{TEM}) e NTE_{KPC}-III (inserção do Tn5563/IS6100) (CHEN et al., 2014). O elemento NTE_{KPC}-I pode ainda ser classificado de acordo com sítios de inserção *upstream* e/ou *downstream* da sequência IS26 e na presença de IS*Kpn8*, como NTE_{KPC}-Ia, NTE_{KPC}-Ib, NTE_{KPC}-Ic e NTE_{KPC}-Id (CHEN et al., 2014). Do mesmo modo, NTE_{KPC}-II pode ser subdividido baseado em diferenças no tamanho do Δ *bla*_{TEM} e nas deleções, em NTE_{KPC}-IIa, NTE_{KPC}-IIb, NTE_{KPC}-IIc e NTE_{KPC}-IId (CHEN et al., 2014; CERDEIRA et al., 2019).

O papel do NTE_{KPC} na disseminação global de KPC ainda é desconhecido, apesar disso, acredita-se que esse elemento tenha evoluído do Tn4401 por recombinação e/ou inserção de outros elementos genéticos móveis menores, pois todas as estruturas de NTE_{KPC} descritas até o momento contêm remanescentes genéticos de Tn4401 (CHEN et al., 2014; CERDEIRA et al., 2019).

Além da importante participação de plasmídeos de diferentes grupos de incompatibilidade e do transposon Tn4401 em clones de alto risco de *K. pneumoniae* (CHEN et al., 2014), outros elementos, como os integrons, têm sido associados à aquisição e disseminação de genes de resistência à antimicrobianos (GILLINGS, 2014). Embora, o integron não seja considerado um elemento móvel em si, por não apresentar funções para a automobilidade (DOMINGUES; SILVA; NIELSEN, 2012), é capaz de incorporar as ORFs (do inglês, *open reading frame*), tornando-as genes funcionais no genoma bacteriano (ROWE-MAGNUS, 2009; CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010).

De modo geral, a estrutura do integron consiste de um gene codificador de uma integrase (*intI*), um sítio de recombinação (*attI*) e um promotor, chamado P1 ou P_{ant}, ou mais raramente por dois promotores (P1 e P2) (LÉVESQUE et al., 1995; DAVIES, 2007; GILLINGS, 2014), como representado na figura 2. A integrase catalisa a recombinação entre o sítio *attI* do integron e o sítio *attC* associado às ORFs, permitindo a inserção ou excisão de um ou mais cassetes gênicos na região variável do integron (GILLINGS, 2014). Além disso, alguns integrons podem conter o gene *qacEΔ1*, que codifica uma versão incompleta de uma proteína que medeia a resistência a certos detergentes, o gene *sulI*, que codifica a resistência a sulfonamidas, e uma ORF, de função desconhecida (GILLINGS, 2014).

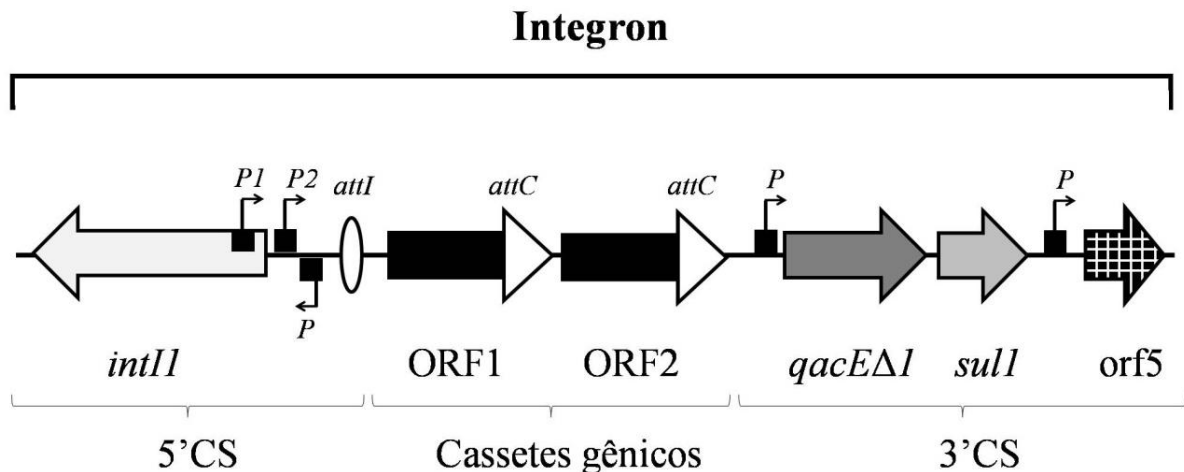


Figura 2. Representação esquemática da estrutura de um integron de classe 1. Setas horizontais representam os genes e a orientação da sua transcrição. O integron é composto por duas regiões conservadas (5'CS e 3'CS) e uma região variável contendo os cassetes gênicos de resistência. *intI1*: integrase 1; *attC*: local de recombinação associado ao cassette; *attI*: sítio de recombinação associado ao integron; *P*, *P1* e *P2*: promotores; *qacEΔ1*: compostos quaternários de amônio e brometo de etídio; *sull*: gene de resistência a sulfonamidas (Fonte: Adaptado de LÉVESQUE et al., 1995; DAVIES, 2007; GILLINGS, 2014).

Diversas classes de integrons foram identificadas com base na sequência de aminoácidos das integrases (*intI1*, *intI2*, *intI3*, *intI4* e *intI5*) (MAZEL, 2006; CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010; CURY et al., 2016; AN et al., 2018), sendo o integron de classe 1 o mais predominante e clinicamente importante em estudos de bactérias multirresistentes (CAMBRAY; GUEROUT; MAZEL, 2010; ESCUDERO et al., 2015; LORESTANI et al., 2018). As cepas de *K. pneumoniae* portadoras de integrons de classe 1 se tornaram cada vez mais comuns (SANTOS et al., 2011), e seu papel na disseminação da resistência a drogas passou a ser expressivo (GHALY et al., 2017). Alguns relatos tem associado os integrons de classe 1 com a presença de genes codificadores de β -lactamases de espectro estendido (ex., *bla*_{CTX-M-15}) (RUI et al., 2018), metalo- β -lactamases (ex., *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}) (RUI et al., 2018), oxacilinas (*bla*_{OXA}) (STALDER et al., 2012; WU et al., 2012; AN et al., 2018; RUI et al., 2018) e genes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR) (ex., *aac(6)**Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB*) (LI et al., 2013; RUI et al., 2018).

K. pneumoniae produtora de carbapenemases e ESBLs comumente apresentam um fenótipo de multirresistência e albergam diversos elementos genéticos móveis (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017), disseminando a resistência aos antimicrobianos por duas razões principais: (i) os elementos genéticos mencionados anteriormente podem ser transmitidos verticalmente, e (ii) os microrganismos possuem inúmeras oportunidades para transferir horizontalmente esses elementos para outras bactérias,

não se limitando a uma disseminação intraespecífica (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017; PARTRIDGE et al., 2018).

5. Disseminação de clones de alto risco

O estudo da epidemiologia de IRAS por bactérias multirresistentes passou por uma grande modernização quanto aos métodos de tipagem molecular, permitindo comparar bactérias no mundo todo e identificar clones emergentes (PÉREZ-LOSADA et al., 2013) capazes de mobilizar genes, potencializando essa a ameaça acerca da resistência aos antimicrobianos (MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015).

Algumas características permitem qualificar clones de alto risco multirresistentes, como: (i) distribuição global, (ii) associação com vários determinantes de resistência antimicrobiana, (iii) capacidade de colonizar e persistir em hospedeiros por longos intervalos de tempo, (iv) capacidade de transmissão eficaz entre os hospedeiros, (v) patogenicidade e aptidão aumentada, e (vi) capacidade de causar infecções graves e/ou recorrentes (MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015).

Determinantes genéticos de resistência e importantes clones têm sido relacionados, como por exemplo, a dispersão de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 pertencente ao do complexo clonal 258 (CG258), que tem ganhado predominância global em virtude da sua alta transmissibilidade (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017; TOLENTINO et al., 2018). O CG258 inclui um ST predominante (ST258) e variantes em um locus (SLVs) desse ST (ex., ST11, ST340, ST437, ST512) (CHEN et al., 2014; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015). O ST258 é frequentemente encontrado na América Latina, América do Norte e na Europa, enquanto que o ST11 prevalece na América Latina e Ásia (CHEN et al., 2014). No Brasil, o ST11, ST340 e ST437, têm sido caracterizados como endêmicos (PEREIRA et al., 2013; SHEN et al., 2016).

Os clones de alto risco de *K. pneumoniae* possuem um arsenal diversificado de genes *bla* (para carbapenemases e/ou ESBL), um resistoma distinto e múltiplos tipos de plasmídeos, refletindo a epidemiologia complexa associada à *K. pneumoniae* (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017). O arsenal de genes de resistência entre os clones reflete a transferência genética horizontal de plasmídeos e transposons circulantes em populações bacterianas em diversas localidades geográficas (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017). No entanto, a realidade brasileira sobre a

epidemiologia molecular de importantes clones (ex., ST11) e o sucesso na disseminação de genes de resistência ainda é nebulosa (ANDRADE et al., 2011; PEREIRA et al., 2013).

Alguns estudos tentam explicar o motivo de clones importantes de *K. pneumoniae*, pertencentes ao ST11 e ST258, obterem sucesso na disseminação, e indicativos mostram a presença do elemento integrativo e conjugativo ICEKp258.1 carreando um sistema de secreção do tipo IV, que possivelmente facilita a propagação de elementos móveis (CHEN et al., 2014; NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017). Assim, compreender características únicas do CG258 e cada um dos ST epidêmicos poderá esclarecer o sucesso desses clones e auxiliar na elaboração de medidas de prevenção e controle de sua dispersão (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017).

6. Virulência

Embora a resistência aos antimicrobianos tenha papel significativo na morbidade, mortalidade e na falha terapêutica (BERENDONK et al., 2015; GONTIJO-FILHO et al., 2016; von WINTERSDORFF et al., 2016), a capacidade de *K. pneumoniae* causar infecções também está associada a uma combinação bem-sucedida com fatores de virulência (HIGHSMITH; JARVIS, 1958; CLEGG; MURPHY, 2016; GIRAUD; YCHLIK; CLOECKAERT, 2017). Em patógenos Gram-negativos os fatores de virulência são inúmeros e diversificados, o que tem sido demonstrado em uma grande quantidade de estudos (HIGHSMITH; JARVIS, 1958; CLEGG; MURPHY, 2016; GIRAUD; YCHLIK; CLOECKAERT, 2017; KHAERTYNOV et al., 2018; KIM et al., 2019). Dentre esses fatores de virulência, em linhagens de *K. pneumoniae*, vale ressaltar a importância das fímbrias, adesinas, lipopolissacarídeos (LPS), ureases, sideróforos, cápsula polissacarídica e formação de biofilme (CLEGG; MURPHY, 2016; KHAERTYNOV et al., 2018).

A cápsula polissacarídica representa o principal mecanismo de virulência de *Klebsiella* spp., e atualmente existem 79 tipos capsulares descritos, que têm sido usados para discriminar cepas durante infecções clínicas (PAN et al., 2015; CLEGG; MURPHY, 2016). A identificação de tipos capsulares pode ser realizada por métodos de genotipagem, através da caracterização de genes responsáveis pela síntese da cápsula polissacarídica (*galF*, *cpsACP*, *wzi*, *wza*, *wzb* e *wzc*) (PAN et al., 2015). Os sorotipos K1, K2, K4 e K5 são altamente virulentos e estão frequentemente associados a infecções graves em humanos e animais (BRISSE et al., 2009). Tentativas de correlacionar os sorotipos individuais das cápsulas com

sítios de infecção e/ou sintomas clínicos têm sido muito contraditórias, entretanto, tem sido documentado que os sorotipos K1 e K2 estão entre os mais comuns tipos capsulares observados em pacientes com abscessos hepáticos e infecções urinárias (TSAY et al., 2002; FEIZABADI; RAJI; DELFANI, 2013).

Adicionalmente, a importância da porção antigênica O dos lipopolissacarídeos como fator de virulência em *K. pneumoniae* também deve ser considerada, especialmente em relação à doenças graves como sepse e pneumonia (EVRARD et al., 2010; HSIEH et al., 2012), e a sua diversidade em cepas K1 e K2, que pode ajudar na evasão do sistema imune do hospedeiro (LEE et al., 2017).

As fimbrias também apresentam grande relevância no desenvolvimento de infecções, pois estão relacionadas à capacidade de uma bactéria aderir nas superfícies dos tecidos hospedeiro (CLEGG; MURPHY, 2016; MARTIN; BACHMAN, 2018). Cepas de *K. pneumoniae* produzem dois principais tipos de fimbrias, as fimbrias do tipo 1 (Fim) e as fimbrias do tipo 3 (Mrk) (CLEGG; MURPHY, 2016; MARTIN; BACHMAN, 2018). As fimbrias do tipo 1 estão presentes em quase todos os membros da família Enterobacteriaceae (MURPHY et al., 2013; CLEGG; MURPHY, 2016), e sua propriedade adesiva se deve principalmente à presença da proteína FimH, codificada pelo gene *fimH*, presente no *cluster* fim (CONNELL et al., 1996; STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2008; MURPHY et al., 2013). Elas medeiam a adesão aos receptores de manose presentes em diversos tecidos humanos, e tem sido associada à aderência do muco, colonização da traqueia e do trato intestinal e interações com as células epiteliais do pulmão (CONEL et al., 1996; PACE et al., 2010). Já as fimbrias do tipo 3, são codificadas pelo *cluster* mrk, contudo, composta primordialmente por duas proteínas, a MrkA e MrkD (CLEGG; MURPHY, 2016). Estudos apontam que a fimbria do tipo 3 está diretamente relacionada com a produção do biofilme bacteriano (MURPHY et al., 2013; CLEGG; MURPHY, 2016; ZHENG et al., 2018).

Outro importante fator de virulência é o sistema de aquisição de ferro, crucial para o metabolismo da maioria das bactérias (CLEGG; MURPHY, 2016; WILSON et al., 2016). A obtenção de ferro é um dos grandes desafios para bactérias durante a infecção, pois o hospedeiro limita a disponibilidade de ferro livre como parte de sua defesa inata contra patógenos (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003; CLEGG; MURPHY, 2016). Os níveis de ferro livre no hospedeiro são reduzidos, tornando-os insuficientes para o crescimento bacteriano, por meio de proteínas ligadoras de ferro (ex.,

transferrina e lactoferrina) (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003; CLEGG; MURPHY, 2016). Assim, 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 (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003; WILSON et al., 2016). *Klebsiella* spp. pode expressar uma grande variedade de sistemas de aquisição de ferro, como as enterobactinas, aerobactinas, yersiniabactina e salmochelinas (BACHMAN et al., 2011), e o ferro adquirido poderá desempenhar papel importante também na produção de biofilme (WILSON et al., 2016).

Dessa forma, pode-se notar que os fatores de virulência são codificados por genes importantes, como aqueles que atuam como regulares transcricionais da síntese de polissacarídeos capsulares (*rmpA*), na biossíntese do núcleo lipopolissacarídeo (*wabG*), no metabolismo de alantoína (*allABCDRS*), na síntese de urease (*ureADE*), codificando *pilus* comum de *E. coli* (*ecpA*), hemolisina (*khe*), fimbrias do tipo 1 (*fimABCDEFGHIK*) e do tipo 3 (*mrkABCDEFHIJ*), aerobactinas (*iucABCD/iutA*) e enterobactinas (*entABCDEF*) (IZQUIERDO et al., 2003; BLACKBURN et al., 2009; CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017; KRAPP et al., 2017; WANG et al., 2018; CANEIRAS et al., 2018).

Além de todos os fatores de virulência que fazem com que os microrganismos tenham maior capacidade de causar danos, esse fato pode ser mais complicado, pois essas cepas podem também apresentar característica hipervirulenta e hiper mucoviscosa (CLEGG; MURPHY, 2016; CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017; SHANKAR et al., 2018; TABRIZI et al., 2018). A hiper mucoviscosidade de uma bactéria é caracterizada pela formação de um filamento viscoso ≥ 5 mm após o alongamento (com um *loop*) de uma colônia em um experimento *in vitro* chamado *string test* (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017). Além de hiper mucoviscosa, a cepa pode também ser hipervirulenta. Apesar de não haver um consenso entre pesquisadores sobre a definição dessas cepas, muitos consideram que cepas hipervirulentas apresentam pelo menos 2 das 3 características microbiológicas: (i) *string test* positivo, (ii) presença do gene *rmpA*, e/ou (iii) presença de gene de aerobactina (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017). Apesar da sua importância, o papel dos fatores de virulência e fenótipos de hiper mucoviscosidade, permanece pouco compreendido, o que tem sido motivo

de interesse por pesquisadores que estudam a epidemiologia de importantes microrganismos, como *K. pneumoniae* (ZHENG et al., 2018; ARAÚJO et al., 2018b).

7. Biofilme

A maioria das infecções causadas por microrganismos produtores de biofilme estão associadas à utilização de dispositivos médicos invasivos, como cateteres venosos, cateteres urinários, próteses, marcapasso cardíaco e outros (PERCIVAL et al., 2015; WU et al., 2015). Nesse contexto, a literatura tem mostrado que cerca de 60% dos dispositivos implantados estão relacionados com a formação de biofilmes, aumentando os custos de tratamento, bem como a mortalidade (VICKERY et al., 2013)

Embora o estudo de biofilmes seja um importante foco de pesquisadores nacionais e internacionais (PERCIVAL et al., 2015; WU et al., 2015; BATISTÃO et al., 2016; CAMPOS et al., 2016; ARAÚJO et al., 2018b; FU et al., 2018; ZHENG et al., 2018), no Brasil, poucos estudos empregam técnicas fenotípicas laboriosas para avaliar estatisticamente a adesão bacteriana, a quantidade de células no biofilme e a formação de biofilme em cepas de diferentes espécimes clínicos (BATISTÃO et al., 2016; CAMPOS et al., 2016; ARAÚJO et al., 2018b).

Campos e colaboradores (2016) avaliaram a produção de biofilme em as cepas de *K. pneumoniae* recuperadas de diferentes espécimes clínicos. Nesse estudo, houve um predomínio de cepas produtoras de biofilme (60% das cepas foram moderadas produtoras e 40% fracas produtoras), e apenas uma cepa não produziu biofilme. Além disso, esses pesquisadores demonstraram que a formação de biofilme não foi associada à multirresistência e a determinados tipos clonais, no entanto, cepas de *K. pneumoniae* mais virulentas tiveram uma tendência a apresentar maior produção de biofilme. Interessantemente, na China, Yang and Zhang (2008) demonstraram a habilidade de 150 cepas de *K. pneumoniae* formar biofilme e sua significativa associação com a produção de ESBLs (43,5%), o que também pode ser observado no estudo de Campos et al. (2016).

Além da relação entre a produção de biofilme e cepas que produzem enzimas associadas à resistência, como a presença de ESBL, outros estudos documentam a formação de biofilme em cepas produtoras de carbapenemases (FU et al., 2018; ARAÚJO et al., 2018b). Fu et al. (2018) observaram alta frequência de genes de virulência e formação de biofilme por cepas produtoras de KPC-2. Do mesmo modo, Araújo e colaboradores (2018b) documentaram a

formação de biofilme na maioria das cepas de *K. pneumoniae* carreando o gene *bla*_{KPC-2} (90,9%) recuperadas de regiões do Brasil, sugerindo ainda uma estreita relação entre o ST437 e a fraca produção de biofilme.

O tratamento de infecções associadas aos biofilmes é especialmente problemático, uma vez que utilizando uma variedade de mecanismos, esses microrganismos podem ser de 10 a 1000 vezes mais resistentes a um antimicrobiano quando comparadas às mesmas células planctônicas (MAH; O'TOOLE, 2001; GIRARD et al., 2010; HENGZHUANG et al., 2011; ZHENG et al., 2018). Além dessa dificuldade, a frequência crescente de resistência aos antimicrobianos entre as espécies formadoras de biofilme torna o tratamento ainda mais difícil (KWON et al., 2008; ZHENG et al., 2018). Adicionalmente, muitas dessas infecções estão relacionadas à linhagem endêmica, como é o caso do ST258 em cepas de *K. pneumoniae*, dessa forma, torna-se importante examinar se essas cepas possuem habilidades únicas de produção de biofilme em comparação com outros STs de *K. pneumoniae* multirresistentes (NAPARSTEK et al., 2014).

8. Epidemiologia molecular na prevenção e controle de IRAS

A associação de vantagens adaptativas observadas no mundo microbiano como a resistência aos antimicrobianos, a virulência e a produção de biofilme, estabelecem um quadro complexo no controle e tratamento das IRAS (BECEIRO; TOMÁS; BOUCORRESPONDING, 2013; WU et al., 2015; CLEGG; MURPHY, 2016; LI; WEBSTER, 2018; MARTIN; BACHMAN, 2018). Como mencionado anteriormente, estudos multicêntricos de prevalência fornecem dados alarmantes sobre essas infecções, principalmente em casos com pior prognóstico (seps e pneumonia) (FORTALEZA et al., 2017; BRAGA et al., 2018) associados com a presença de microrganismos resistentes a uma ampla variedade de antimicrobianos (BRAGA et al., 2018; WALASZEKA et al., 2018; HAQUE et al., 2018). Dessa forma, há um consenso dos especialistas na área quanto à necessidade de tomada de ações estratégicas para a redução das IRAS (ANVISA, 2016).

De acordo com diversos autores que discutem amplamente essa questão, a ANVISA propõe que a eliminação de IRAS irá depender de quatro ações importantes: (i) viabilizar a adesão a práticas baseadas em evidência, educando, implementando e realizando investimentos; (ii) preencher as lacunas de conhecimento para responder a ameaças por meio de pesquisas básicas e epidemiológicas; (iii) expandir a sustentabilidade a partir da

disponibilidade recursos e investimentos em estratégias que demonstrarem sucesso; (iv) reunir dados para direcionar esforços de prevenção e avaliar os avanços (ANVISA, 2013; ANVISA, 2016).

Adicionalmente, a resistência aos antimicrobianos passou a ser um dos temas de maior relevância no contexto de vigilância e monitoramento de IRAS (JOHNSON, 2015; TACCONELLI et al., 2018), particularmente em países de baixa e média renda como o Brasil onde as infecções causadas por esses microrganismos tem se tornado cada vez mais comuns (FOUNOU et al., 2017), exigindo assim, principalmente dos setores governamentais um olhar mais profundo (CDC, 2015; WHO, 2018).

Algumas estratégias foram implementadas, como por exemplo, em 2015 a Assembleia Mundial aprovou um Plano de Ação Global em Resistência Microbiana que tratou de melhorar e fortalecer a compreensão da resistência e do conhecimento, reduzir a incidência de infecções, otimizar o uso de antimicrobianos em todas as áreas e garantir investimentos suficientes para o controle de IRAS (WHO, 2015).

Nesse contexto, além de evidências da literatura com diversos estudos epidemiológicos (MUNOZ-PRICE et al., 2013; PADOVEZE; FORTALEZA, 2014; FORTALEZA et al., 2017; BRAGA et al., 2018), as pesquisas vêm utilizando com sucesso métodos de tipagem molecular para a investigação dos microrganismos associados às IRAS, dos surtos e modo de transmissão (pessoa a pessoa, com superfícies ambientais e/ou dispositivos invasivos), fornecendo uma visão da circulação e emergência de novos fenótipos, podendo auxiliar no esclarecimento de prováveis reservatórios desses microrganismos, a fim de contribuir com estratégias baseadas em evidências para conter a disseminação de microrganismos epidemiologicamente importantes associados à colonização e/ou infecção e reduzir as taxas de infecção ao mínimo (van BELKUM et al., 2007; BOCCIA et al., 2015).

O método de tipagem molecular, denominado *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) permite determinar se os microrganismos epidemiologicamente importantes são também geneticamente relacionados, auxiliando na detecção de surtos, na identificação das vias de transmissão e fontes de infecção (SABAT et al., 2013). O PFGE trata-se de uma técnica muito utilizada em estudos epidemiológicos, inclusive das IRAS, com alto poder discriminatório, tipabilidade e reprodutibilidade (GALETTI, 2010; SABAT et al., 2013). Adicionalmente, outra importante metodologia, denominada *Multilocus Sequence Typing* (MLST), tem sido amplamente empregada na determinação de tipos de sequências (ST) e grupos clonais (CG)

de patógenos de interesse epidemiológico a partir da designação de perfis de alelos com base no sequenciamento de genes específicos (LARSEN et al., 2012). Essas metodologias são importantes, pois compreender a clonalidade entre microrganismos pode auxiliar no rápido estabelecimento do grau de relacionamento entre eles, resultando em uma implementação mais rápida de medidas preventivas (BOCCIA et al., 2015). No caso de ausência de clonalidade, pode ainda evitar providências desnecessárias quando se aguarda as investigações tradicionais (BOCCIA et al., 2015).

Aliado às metodologias de tipagem molecular, novas tecnologias têm evoluído rapidamente e entre elas inclui a tecnologia de sequenciamento de nova geração (BUERMANS; DEN DUNNEN, 2014; BESSER et al., 2018). O sequenciamento do genoma completo tem se tornado uma importante ferramenta associada à microbiologia, pois fornece uma série de aplicações, e permite análise mais abrangente dos genomas microbianos, incluindo aspectos relacionados ao resistoma, viruloma e mobiloma de patógenos em diferentes ecossistemas (FORDE; O'TOOLE, 2013; RAMOS et al., 2014; LOMONACO et al., 2018; ARABAGHIAN et al., 2019). Desta forma, também se torna favorável para investigar a transmissão de importantes patógenos e a disseminação dos plasmídeos envolvidos na transferência de genes de resistência (HAZEN et al., 2014). Adicionalmente, essa técnica permite o estudo de epidemias mundiais, surtos regionais e melhor compreensão da evolução filogenética de agentes infecciosos (SNITKIN et al., 2012; GILCHRIST et al., 2015; MATHERS et al., 2015; KAN et al., 2018).

Assim, a análise do genoma bacteriano revolucionou o estudo de várias áreas de pesquisa e tem despertado muito interesse nos últimos anos (HEARD et al., 2010; WADE; ELLIOTT, 2017; REVEZ et al., 2017). No entanto, apesar dessa técnica ter passado por melhoras significativas, principalmente em relação à acurácia e ao custo, ainda apresenta algumas limitações (QUAINOO et al., 2017).

Considerando-se todos os fatores apresentados, é evidente que a aplicação de técnicas moleculares aos estudos epidemiológicos aumentou nossa compreensão sobre doenças infecciosas, principalmente relacionadas à identificação de fontes de agentes infecciosos, reservatórios, probabilidade e padrões de circulação e transmissão (EYBPOOSH et al., 2017). As informações obtidas em cada um dos aspectos acima ajudam os profissionais no desenvolvimento de estratégias mais eficazes de prevenção e controle nos níveis individual e populacional (EYBPOOSH et al., 2017).

A recente história sobre o controle de IRAS no Brasil sofreu impacto importante de eventos epidêmicos e apesar de algumas iniciativas, há falta de informação qualificada sobre IRAS para a população, incluindo o papel do próprio paciente e de seus familiares nesse processo (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014). Atualmente, um trabalho conjunto com o objetivo de reduzir taxas de IRAS deve envolver a análise da similaridade entre cepas bacterianas, bem como o estudo do DNA por sequenciamento do genoma em associação aos testes fenotípicos (FERRARI; PANZENHAGEN; CONTE-JUNIOR, 2017; QUAINOO et al., 2017; HUGHES; ANDERSSON, 2017). Esses esforços poderão fornecer informações mais precisas, que permitam melhor equacionamento das estratégias de intervenção e planejamento para o controle da disseminação de clones de alto risco no ambiente (QUAINOO et al., 2017; HUGHES; ANDERSSON, 2017). Em ocasiões de surto, a identificação do clone relacionado às infecções e vias de disseminação pode ainda permitir um controle mais rápido e eficaz, levando a uma consequente diminuição de mortes por IRAS (KWOK et al., 2007; DUCOMBLE et al., 2015).

9. Referências

ABBOUD, C. S. et al. First report of investigation into an outbreak due to carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary Brazilian hospital, with extension to a patient in the community. **J. Infect. Prev.**, v. 12, p. 150-153, Mar. 2011.

<https://doi.org/10.1177/1757177411401453>

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, v. 146, p. 837–8, Dez. 1940.

AGEEVETS, V. et al. Genetic Environment of the *bla*_{KPC-2} Gene in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate That May Have Been Imported to Russia from Southeast Asia. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 24, n. 61(2), p. pii: e01856-16, Jan. 2017.

<https://doi:10.1128/AAC.01856-16>

AINODA, Y. et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 isolated from a Japanese patient without a history of foreign travel - a new public health concern in Japan: a case report. **BMC Infect Dis.**, v. 7, n. 19(1), p. 20, Jan. 2019.

<https://doi:10.1186/s12879-018-3649-9>

ALBERTI, C. et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v. 28, n. 2, p. 108-121, Feb. 2002.

<https://doi.org/10.1007/s00134-001-1143-z>

ALLEGIANZI, B. et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, London, v. 377, n. 9761, p. 228-241, Jan. 2011.

[https://doi:10.1016/S0140-6736\(10\)61458-4](https://doi:10.1016/S0140-6736(10)61458-4)

ALLEN, S. Prevention and control of infection in the ICU. **Current Anaesthesia & Critical Care**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 191-199, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.cacc.2006.01.003>

ALMEIDA, A. C. et al. *Escherichia coli* ST502 and *Klebsiella pneumoniae* ST11 sharing an IncW plasmid harbouring the *bla*_(KPC-2) gene in an Intensive Care Unit patient. **Int J Antimicrob Agents**, v. 40, n. 4, p. 374-6, Oct. 2012.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.05.022>

ALP, E.; DAMANI, N. Healthcare-associated infections in intensive care units: epidemiology and infection control in low-to-middle income countries. **Journal of Infection in Developing Countries**, Italy, v. 9, n. 10, p. 1040-1045, Oct. 2015.

<https://doi:10.3855/jidc.6832>

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamase. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 289, p. 321-331, Mai. 1980.

<https://doi: 0.1098/rstb.1980.0049>

ANDRADE, L. N. et al. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* Species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.7, p. 3579–3583, Jul. 2011.

<https:// doi: 10.1128/AAC.01783-10>

ANDRADE, L. N.; DARINI, A.L.C. Response to Detection of New Delhi Metallo-β-Lactamase– Producing Bacteria, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.21, n.6, p. 1069-1070, Jun. 2015.

<https:// doi: 10.3201/eid2106.140113>

ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiol Rev**. v. 27, n. 2-3, p. 215-37, Jun. 2003.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Prevenção e **Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS) 2013 – 2015.**

2013. Disponível em

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/272166/Programa+Nacional+de+Preven%C3%A7%C3%A3o+e+Controle+de+Infec%C3%A7%C3%B5es+Relacionadas+%C3%A0+Assist%C3%A2ncia+%C3%A0+Sa%C3%BAde+%282013-2015%29/d1d0601f-004c-40e7-aaa5-0af7b32ac22a>>. Acesso em: Mar. 2019.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional De Prevenção E Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (2016-2020).** 2016. Disponível

em <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3074175/PNPCIRAS+2016-2020/f3eb5d51-616c-49fa-8003-0dcb8604e7d9>>. Acesso em: Mar. 2019.

ARABAGHIAN, H. Molecular Characterization of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella quasipneumoniae* Isolated from Lebanon. **Sci Rep.**, v. 24, n. 9(1), p. 531, Jan. 2019.

[https://doi: 10.1038/s41598-018-36554-2](https://doi.org/10.1038/s41598-018-36554-2)

ARAÚJO, B. F. et al. Clinical and Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *P. aeruginosa* Carrying *aac(6')-Ib-cr*, *qnrS1* and *bla_{SPM}* Genes in Brazil. **PLoS One**, v. 24, n. 11(5), p. e0155914, Mai. 2016.

[https:// doi: 10.1371/journal.pone.0155914](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155914)

ARAÚJO, B. F. et al. Hypervirulence and biofilm production in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil. **J Med Microbiol.**, v. 67, n. 4, p. 523-528, Abr. 2018b.

[https:// doi: 10.1099/jmm.0.000711](https://doi.org/10.1099/jmm.0.000711)

ARAÚJO, B. F. et al. Insights into a novel Tn4401 deletion (Tn4401i) in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical strain belonging to the high-risk clonal group 258 producing KPC-2. **Int J Antimicrob Agents.** v. 52, n. 4, p. 525-527, Out. 2018a.

[https://doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.08.011](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.08.011)

BACHMAN, M. A. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. **Infect Immun.**, v. 79, n. 8, p. 3309-16, Ago. 2011.

<https://doi: 10.1128/IAI.05114-11>

BARANIAK, A. et al. KPC-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae colonizing patients in Europe and Israel. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 28, n. 60(3), p. 1912–1917, Dez. 2015.

<https://doi.org/10.1128/AAC.02756-15>

BARON, S. et al. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **Int J Antimicrob Agents**, v. 48, n. 6, p. 583-591, Dez. 2016.

<https://doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023>

BATISTÃO, D. W. F. et al. Biofilm formation of Brazilian meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: prevalence of biofilm determinants and clonal profiles. **J Med Microbiol.**, v. 65, n. 4, p. 286-297, Abr. 2016.

<https://doi: 10.1099/jmm.0.000228>

BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOUCORRESPONDING, G. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? **Clin Microbiol Rev.**, v. 26, n. 2, p. 185–230, Abr. 2013.

<https://doi: 10.1128/CMR.00059-12>

BEIRÃO, E. M. et al. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 69-73, Jan. 2011.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702011000100013>

BENGOCHEA, J. A.; PESSOA, J. S. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. **FEMS Microbiology Reviews**, v. fuy043, Nov. 2018.

<https://doi.org/10.1093/femsre/fuy043>

BERENDONK, T. U. et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework.

Nature Reviews Microbiology, v. 13, p. 310-317, Mai 2015.

<https://doi:10.1038/nrmicro3439>

BERTONCHELI, C. M.; HÖRNER, R. A review on metallo- β -lactamases. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 44, n. 4, Out. 2008.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322008000400005>

BESSER, J. et al. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. **Clin Microbiol Infect.**, v. 24, n. 4, p. 335-341, Abr. 2018.

<https://doi:10.1016/j.cmi.2017.10.013>

BEVAN, E. R.; JONES, A. M.; HAWKEY, P. M. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. **J Antimicrob Chemother.** v. 1, n. 72(8), p. 2145-2155, Ago. 2017.

<https://doi:10.1093/jac/dkx146>

BISWAS, S. et al. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v. 10, p. 917-934, Ago. 2012.

<https://doi.org/10.1586/eri.12.78>

BLACKBURN, D. Distribution of the *Escherichia coli* common pilus among diverse strains of human enterotoxigenic *E. coli*. **J Clin Microbiol.**, v. 47, n. 6, p. 1781-4, Jun. 2009.

<https://doi:10.1128/JCM.00260-09>

BOCCIA, S. et al. Molecular epidemiology tools in the management of healthcare-associated infections: towards the definition of recommendations. **Epidemiol Prev.**, v. 39, n. 4 (Suppl 1), p. 21-6, Jul 2015.

BONOMO, R. A. β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, v. 3, n.7(1), p. pii: a025239, Jan. 2017.

<https://doi:10.1101/cshperspect.a025239>

BRAGA, I. A. **Estudo Multicêntrico de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde Em Unidades De Terapia Intensiva De Adultos No Estado De Minas Gerais, Brasil.** 2019. 76 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

BRAGA, I. A. et al. Multi-Hospital Point Prevalence Study of Healthcare-Associated Infections in 28 Adult Intensive Care Units in Brazil. **The Journal of Hospital Infection**, New York, v. 99, n. 3, p. 318-324, Jul. 2018.
<http://doi: 10.1016/j.jhin.2018.03.003>

BRISSE, S. et al. Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. e4982, Mar. 2009.
<https://doi: 10.1371/journal.pone.0004982>

BRYANT, K. A. et al. KPC-4 is encoded within a truncated Tn4401 in an IncL/M plasmid, pNE1280, isolated from *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 57, p. 37– 41, Jan. 2013.
<https://doi: 10.1128/AAC.01062-12>

BUCKNER, M. M. C.; CIUSA, M. L.; PIDDOCK, L. J. V. Strategies to combat antimicrobial resistance: anti-plasmid and plasmid curing. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 1, n. 42(6), p. 781-804, Nov. 2018.
<https://doi: 10.1093/femsre/fuy031>

BUERMANS, H. P.; DEN DUNNEN, J. T. Next generation sequencing technology: Advances and applications. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1842, n. 10, p. 1932-1941, Out. 2014.
<https://doi: 10.1016/j.bbadis.2014.06.015>

BUSH K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 62, n. 10, p. pii: e01076-18, Set. 2018.

BUSH, K. Bench-to-bedside review: The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. **Critical Care**, v. 14, p. 224, Jun. 2010.

<https://doi: 10.1186/cc8892>

BUSH, K.; JACOB, G. A.; MEDEIROS, A. A. A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p.1211-1233, Jun. 1995.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of B-Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, Mar. 2010.

<https://doi:10.1128/AAC.01009-09>

CAMBRAY, G.; GUEROUT, A.; MAZEL, D. Integrins. **Annu. Rev. Genet.**, v. 44, p. 141–66, 2010.

<https://doi: 10.1146/annurev-genet-102209-163504>

CAMPOS, P. A. et al. Multidrug Resistance Related to Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains from Different Pulsotypes. **Curr Microbiol.**, v. 72, n. 5, p. 617-27, Mai. 2016.

<https://doi: 10.1007/s00284-016-0996-x>

CANEIRAS, C. et al. Virulence and resistance determinants of *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Portuguese tertiary university hospital centre over a 31-year period. **Enferm Infecc Microbiol Clin.** p. pii: S0213-005X(18)30369-0, Dez. 2018.

<https://doi: 10.1016/j.eimc.2018.11.001>

CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. **Front Microbiol.** v. 3, p. 110, Abr. 2012.

<https://doi: 10.3389/fmicb.2012.00110>

CARATTOLI, A. et al. Differentiation of IncL and IncM Plasmids Associated with the Spread of Clinically Relevant Antimicrobial Resistance. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0123063, Mai. 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123063>

CARATTOLI, A. et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, p. 3895-3903, Jul. 2014.

<https://doi: 10.1128/AAC.02412-14>

CARDOSO, T. et al. Classification of healthcare-associated infection: a systematic review 10 year after the first proposal. **BMC Medicine**, London, v. 12, n. 1, p. 40, Mar. 2014.

<https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-40>

CASTANHEIRA, M. et al. Rapid Expansion of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Two Texas Hospitals due to Clonal Spread of ST258 and ST307 Lineages. **Microbial Drug Resistance**, v. 00, n. 0, p. 1-3, Ago. 2013.

<https://doi:10.1089/mdr.2012.0238>

CATALÁN-NÁJERA, J. C.; GARZA-RAMOS, U.; BARRIOS-CAMACHO, H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two diferente but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes?. **Virulence**, v. 8, n. 7, p. 1111-1123, Out. 2017.

<https://doi: 10.1080/21505594.2017>

CDC, CENTER FOR DISEASE CONTROL. **National Action Plan for Combating Antibiotic-Resistant Bacteria**. 2015. Disponível em <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/national_action_plan_for_combating_antibiotic-resistant_bacteria.pdf>. Acesso em: Mar. 2019.

CERDEIRA, L. T. et al. Small IncQ1 and Col-Like Plasmids Harboring *bla*_{KPC-2} and Non-Tn4401 Elements (NTE_{KPC-II}d) in High-Risk Lineages of *Klebsiella pneumoniae* CG258. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 26, n. 63(3), p. pii: e02140-18, Fev. 2019.

<https://doi:10.1128/AAC.02140-18>.

CERDEIRA, L. T. et al. IncX3 plasmid harboring a non-Tn4401 genetic element (NTE_{KPC}) in a hospital-associated clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST340/CG258.

Diagn Microbiol Infect Dis., v. 89, n. 2, p. 164-167, Out. 2017.

[https://doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.022](https://doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.022).

CHAGAS, T. P. et al. Diversity of genotypes in CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in different hospitals in Brazil. **Braz J Infect Dis.**, v. 15, n. 5, p. 420-5, Set. 2011.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702011000500002>

CHAVES, L. et al. High mortality of bloodstream infection outbreak caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* producing SPM-1 in a bone marrow transplant unit. **J Med Microbiol.**, v. 66, n. 12, p. 1722-1729, Dez. 2017.

<https://doi:10.1099/jmm.0.000631>

CHEN, H. C. et al. Outcome of inadequate empirical antibiotic therapy in emergency department patients with community-onset bloodstream infections. **J Antimicrob Chemother.**, v. 68, n. 4, p. 947-53, Abr. 2013.

[https://doi: 10.1093/jac/dks475](https://doi:10.1093/jac/dks475)

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

<https://doi:10.1016/j.tim.2014.09.003>

CHEN, L. et al. Partial Excision of *bla*_{KPC} from Tn4401 in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 56, n. 3, p. 1635–1638 Mar. 2012.

[https://doi: 10.1128/AAC.06182-11](https://doi:10.1128/AAC.06182-11)

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

<https://doi: 10.1128/AAC.00025-17>

CLEGG, S.; MURPHY, C. N. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiol Spectr.**, v. 4, n. 1, Fev. 2016.

[https:// doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012](https://doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012)

CONNELL, I. et al. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 3, n. 93(18), p. 9827–9832, Set. 1996.

CORNEJO-JUÁREZ, P. et al. The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 31, p. 31-4, Fev. 2015.

<https://doi:10.1016/j.ijid.2014.12.022>. Epub 2014 Dec 17

COUTURIER, M. et al. Identification and classification of bacterial plasmids. **Microbiol Rev.**, v. 52, n. 3, p. 375-95, Set. 1988.

CURY, J. et al. Identification and analysis of integrons and cassette arrays in bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 2, n. 44(10), p. 4539–4550, Jun. 2016.

[https:// doi: 10.1093/nar/gkw319](https://doi.org/10.1093/nar/gkw319)

CUZON, G.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in *bla*_{KPC} gene mobilization. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 55, n. 11, p. 5370-3, Nov. 2011.

[https://doi: 10.1128/AAC.05202-11](https://doi.org/10.1128/AAC.05202-11)

DAI, X. et al. The IncP-6 Plasmid p10265-KPC from *Pseudomonas aeruginosa* Carries a Novel ΔISEc33-Associated *bla*_{KPC-2} Gene Cluster. **Front Microbiol.**, v. 7, p. 310, Mar. 2016.

[https:// doi:10.3389/fmicb.2016.00310](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00310)

D'ANDREA, M. M. et al. CTX-M-type β-lactamases: a successful story of antibiotic resistance. **Int J Med Microbiol.** v. 303, n. 6-7, p. 305-17, Ago. 2013.

[https://doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.008](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.008)

DANTAS, R. C. C. et al. Molecular epidemiological survey of bacteremia by multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: the relevance of intrinsic resistance mechanisms. **PLoS One.** v. 12, n. 5, p. e0176774, Mai. 2017.

[https://doi:10.1371/journal.pone.0176774](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176774)

DATTA, N.; HUGHES, V. M. Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. **Nature**, v. 8-14, n. 306(5943), p. 616-7, Dez. 1983.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 74, n. 3, p. 417–433, Set. 2010.

[https://doi: 10.1128/MMBR.00016-10](https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10)

DAVIES, J. Microbes have the last word. A drastic re-evaluation of antimicrobial treatment is needed to overcome the threat of antibiotic-resistant bacteria. **EMBO Rep.**, v. 8, n. 7, p. 616–621, Jul. 2007.

<https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401022>

DE BELDER, D. et al. Genetic Diversity of KPC-Producing *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, and *Citrobacter freundii* Isolates from Argentina. **Microb Drug Resist.**, v. 24, n. 7, p. 958-965, Set. 2018.

<https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0213>

DHILLON, R.; CLARK, J. Infection in the intensive care unit (ICU). **Current Anaesthesia & Critical Care**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 175-182, Ago. 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.cacc.2009.01.003>

DOMINGUES, S.; SILVA, G. J.; NIELSEN, K. M. Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. **Mob Genet Elements.**, v. 1, n. 2(5), p. 211–223, Set. 2012.

<https://doi.org/10.4161/mge.22967>

DORTET, L. et al. Dissemination of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* in Romania. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59, n. 11, p. 7100–7103, Nov. 2015.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01512-15>

DUCOMBLE, T. et al. Large hospital outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*: investigating mortality and the impact of screening for KPC-2 with polymerase chain reaction. **J Hosp Infect.** v. 89, n. 3, p. 179-85, Mar. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.11.012>

EIAMPHUNGORN, W. et al. Tackling the Antibiotic Resistance Caused by Class A β -Lactamases through the Use of β -Lactamase Inhibitory Protein. **Int J Mol Sci.** v. 19, n. 8, p. 2222, Aug. 2018.

<https://doi: 10.3390/ijms19082222>

ENGEL, L. S. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Trends, Risk Factors, and Treatments. **Emergency Medicine**, Nov. 2009.

ESCUDERO, J. A. et al. The Integron: Adaptation On Demand. **Microbiol Spectr.**, v. 3, n. 2, p.MDNA3-0019-2014, Abr. 2015.

<https://doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0019-2014>

EVARD, B. et al. Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. **Infect Immun.**, v. 78, n. 1, p. 210-9, Jan. 2010.

<https://doi: 10.1128/IAI.00864-09>

EYBPOOSH, S. Molecular epidemiology of infectious diseases. **Electron Physician.**, v. 9, n. 8, p. 5149–5158, Ago. 2017.

<https://doi: 10.19082/5149>

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **Clin Infect Dis.**, v. 40, p. 1333–1341, Mai. 2005.

<https://doi.org/10.1086/429323>

FEIZABADI, M. M.; RAJI, N.; DELFANI S. Identification of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 Capsular Types by PCR and Quellung Tes. **Jundishapur J Microbiol.**, v. 6, n. 9, p. e7585, Nov. 2013.

FENG, W. et al. Dissemination of IMP-4-encoding pIMP-HZ1-related plasmids among *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in a Chinese teaching hospital. **Sci Rep.**, v. 6, p. 33419, Set. 2016.

<https://doi: 10.1038/srep33419>

FENG, Y. et al. The coexistence of three *bla*_{KPC-2} genes on an IncF/IncR plasmid in ST11 *Klebsiella pneumoniae*. **J Glob Antimicrob Resist.**, v. 26, p. pii: S2213-7165(18)30233-9, Nov. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.11.017>

FERNANDES, M. R. et al. Colistin-Resistant *mcr-1*-Positive *Escherichia coli* on Public Beaches, an Infectious Threat Emerging in Recreational Waters. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 27, n. 61(7), Jun. 2017.

<https://doi: 10.1128/AAC.00234-17>

FERNANDES, M. R. et al. First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the *mcr-1* Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 Isolate from a Human Infection in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 23, n. 60(10), p. 6415-7, Set. 2016.

<https://doi:10.1128/AAC.01325-16>

FERRARI, R. G.; PANZENHAGEN, P. H. N.; CONTE-JUNIOR, C. A. Phenotypic and Genotypic Eligible Methods for *Salmonella Typhimurium* Source Tracking. **Front Microbiol.**, v. 22, n. 8, p. 2587, Dez. 2017.

<https://doi: 10.3389/fmicb.2017.02587>

FORDE, B. M.; O'TOOLE, P. W. Next-generation sequencing technologies and their impact on microbial genomics. **Brief Funct Genomics**, v. 12, n. 5, p. 440-53, Set. 2013.

<https://doi: 10.1093/bfgp/els062>

FORTALEZA, C. M. C. B. et al. Multi-state survey of health care-associated infections in acute care hospitals in Brazil. **The Journal of Hospital Infection**, New York, v. 96, n. 2, p. 139-144, Jun. 2017.

<https://doi:10.1016/j.jhin.2017.03.024>

FOUNOU, R. C. et al. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 12, n. 12, p. e0189621, Dez. 2017.

<https://doi: 10.1371/journal.pone.0189621>

FU, L. et al. Frequency of virulence factors in high biofilm formation *bla*_{KPC-2} producing *Klebsiella pneumoniae* strains from hospitals. **Microb Pathog.**, v. 116, p. 168-172, Mar. 2018.

<https://doi:10.1016/j.micpath.2018.01.030>

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 354-60, Ago.2012.

<https://doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007>. Epub 2012 May 31.

GALETTI, R. **Estudo de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamases e de genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos**. 49 f. Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil. 2010.

GALETTI, R. et al. New Small Plasmid Harboring *bla*_{KPC-2} in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 60, n. 5, p. 3211–3214, Mai. 2016.

<https://doi: 10.1128/AAC.00247-16>

GAYNES, R. The impact of antimicrobial use on the emergence of antimicrobial-resistant bacteria in hospitals. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 11, n. 4, p. 757-65, Dez. 1997.

GHALY, T. M. et al. Evolution of class 1 integrons: Mobilization and dispersal via food-borne bacteria. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0179169, Jun. 2017.

<https://doi: 10.1371/journal.pone.0179169>

GILCHRIST, C. A. et al. Whole-genome sequencing in outbreak analysis. **Clin Microbiol Rev.**, v. 28, n. 3, p. 541-63, Jul. 2015.

[https://doi: 10.1128/CMR.00075-13](https://doi.org/10.1128/CMR.00075-13)

GILLINGS, M. R. Integrons: past, present, and future. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 78, n. 2, p. 257-77, Jun. 2014.

[https:// doi: 10.1128/MMBR.00056-13](https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13)

GIRARD, L. P. et al. MIC versus MBEC to determine the antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* in peritoneal dialysis peritonitis. **Peritoneal Dialysis International**, v. 30, n. 6, p. 652-6, Nov. 2010.

[https:// doi: 10.3747/pdi.2010.00010](https://doi.org/10.3747/pdi.2010.00010)

GIRAUD, E.; YCHLIK, I.; CLOECKAERT A. Editorial: Antimicrobial Resistance and Virulence Common Mechanisms. **Front Microbiol.**, v. 8, p. 310, 2017.

[https://doi: 10.3389/fmicb.2017.00310](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00310)

GOMEZ, S. A. et al. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. **Clin Microbiol Infect.**, v. 17, n. 10, p. 1520-4, Out. 2011.

[https://doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03600.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03600.x)

ROSSI, I. G. et al. Outbreaks of colistin-resistant and colistin-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Brazilian intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 4, p. 322-329, Dez. 2016.

[https://doi: 10.1016/j.jhin.2016.08.019](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.08.019)

GONTIJO FILHO, P. P. et al. Spread of Multidrug-resistant microorganisms: a global threat and critical healthcare problem. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, Santa Cruz do Sul, v. 6, n. 3, Jul. 2016. ISSN 2238-3360.

<http://dx.doi.org/10.17058/reci.v6i3.7062>

GOOTZ, T. D. The global problem of antibiotic resistance. **Critical Reviews in Immunology**, Boca Raton, v. 30, n. 1, p. 79-93, 2010.
<https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v30.i1.60>

HAQUE, M. et al. Health care-associated infections – an overview. **Infect Drug Resist.**, v. 11, p. 2321–2333, Nov. 2018.
<https://doi: 10.2147/IDR.S177247>

HARDIMAN, C. A. et al. Horizontal Transfer of Carbapenemase-Encoding Plasmids and Comparison with Hospital Epidemiology Data. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 22, n. 60(8), p. 4910-9, Jul. 2016.
<https://doi: 10.1128/AAC.00014-16>

HAZEN, T. H. et al. Comparative genomics of an IncA/C multidrug resistance plasmid from *Escherichia coli* and *Klebsiella isolates* from intensive care unit patients and the utility of whole-genome sequencing in health care settings. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 58, n. 8, p. 4814-25, Ago. 2014.
<https://doi: 10.1128/AAC.02573-14>

HE, S. et al. Mechanisms of Evolution in High-Consequence Drug Resistance Plasmids. **MBio**, v. 6, n. 7(6), p. pii: e01987-16, Dez. 2016.
<https://doi: 10.1128/mBio.01987-16>

HEARD, E. et al. Ten years of genetics and genomics: what have we achieved and where are we heading? **Nat Rev Genet.**, v. 11, n. 10, p. 723–733, Out. 2010.
<https://doi: 10.1038/nrg2878>

HENDRIK, T. C.; VOOR IN 'T HOLT, A. F.; VOS, M. C. Clinical and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella* spp.: A Systematic Review and Meta-Analyses. **PLoS One**, v. 20, n. 10(10), p. e0140754, Out. 2015.
<https://doi: 10.1371/journal.pone.0140754>

HENGZHUANG, W. et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4469-74, Set. 2011.

<https://doi: 10.1128/AAC.00126-11>

HERNÁNDEZ, G. et al. Nosocomial lung infections in adult intensive care units. **Microbes and Infection**, Paris, v. 6, n. 11, p. 1004-1014, Set. 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.05.019>

HIGHSMITH, A. K.; JARVIS, W. R. *Klebsiella pneumoniae*: selected virulence factors that contribute to pathogenicity. **Infect Control**, v. 6, n. 2, p. 75-7, Fev. 1985.

HOU, X. H. Molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 759-768, Jul. 2015.

<https://doi: 10.1590/S1517-838246320140138>

HSIEH, P. F. et al. Lipopolysaccharide O1 antigen contributes to the virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing pyogenic liver abscess. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33155, 2012.

<https://doi: 10.1371/journal.pone.0033155>

HUGHES, D.; ANDERSSON, D. I. Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 41, n. 3, p. 374–391, Mai. 2017.

<https://doi:10.1093/femsre/fux004>

HUTTNER, A. et al. Therapeutic drug monitoring of the b-lactam antibiotics: what is the evidence and which patients should we be using it for? **J Antimicrob Chemother.** v. 70, p. 3178–3183, 2015.

<https://doi: 10.1093/jac/dkv201>

IZQUIERDO, L. et al. The *Klebsiella pneumoniae wabG* gene: role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence. **J Bacteriol.**, v. 185, n. 24, p. 7213-21, Dez. 2003.

JOHNSON, A. P. Surveillance of antibiotic resistance. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 5, n. 370(1670), p. 20140080, Jun. 2015.

<https://doi: 10.1098/rstb.2014.0080>

KAN, B. et al. Transforming bacterial disease surveillance and investigation using whole-genome sequence to probe the trace. **Front Med.**, v. 12, n. 1, p. 23-33, Fev. 2018.

<https://doi: 10.1007/s11684-017-0607-7>

KARAM, G. et al. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. **Crit Care.**, v. 22, n. 20(1), p. 136, Jun. 2016.

<https://doi: 10.1186/s13054-016-1320-7>

KHAERTYNOV, K. S. et al. Virulence Factors and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated From Neonates With Sepsis. **Front Med (Lausanne)**, v. 14, n. 5, p. 225, Ago. 2018.

<https://doi: 10.3389/fmed.2018.00225>

KIFFER, C. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. **Braz J Infect Dis.**, v. 9, n. 3, p. 216-24, Jun. 2005.

<https://doi: S1413-86702005000300004>

KIM, D. et al. Antimicrobial resistance and virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* affecting 30 day mortality in patients with bloodstream infection. **J Antimicrob Chemother.**, v. 1, n. 74(1), p. 190-199, Jan. 2019.

<https://doi: 10.1093/jac/dky397>

KIM, S. Y.; KO, K. S. Diverse Plasmids Harboring *bla*_{CTX-M-15} in *Klebsiella pneumoniae* ST11 Isolates from Several Asian Countries. **Microb Drug Resist** v. 25, n. 2, p. 227-232, Mar. 2019.

<https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0020>

KO, W. C. et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 160–6, Feb. 2002.

<https://doi.org/10.3201/eid0802.010025>

KONG, K. F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. **APMIS**, v.118, n. 1, p. 1-36, Jan. 2010.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x>

KRAPP, F. Virulence Characteristics of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains from Patients with Necrotizing Skin and Soft Tissue Infections. **Sci Rep.**, v. 19, n. 7(1), p. 13533, Oct. 2017.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-13524-8>

KWOK, K. O. et al. Using models to identify routes of nosocomial infection: a large hospital outbreak of SARS in Hong Kong. **Proc Biol Sci.**, v. 7, n. 274(1610), p. 611–618, Mar. 2007.

<https://doi.org/10.1098/rspb.2006.0026>

KWON, A. S. et al. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 1, p. 68-72, Jul. 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.02.009>

LARSEN, M. V. et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. **J Clin Microbiol.**, v. 50, n. 4, p. 1355-61, Apr. 2012.

<https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>

LEE, C. et al. Global dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic context, Treatment options, and Detection methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-30, Jun. 2016.

<https://doi:10.3389/fmicb.2016.00895>

LEE, C. R. et al. Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 21, n. 7, p. 483, Nov. 2017.

<https://doi:10.3389/fcimb.2017.00483>

LÉVESQUE, C. et al. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 39, n. 1, p. 185-91, Jan. 1995.

LI, B. et al. Structural diversity of class 1 integrons and their associated gene cassettes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a hospital in China. **PLoS One**, v. 30, n. 8(9), p. e75805, Set. 2013.

<https://doi:10.1371/journal.pone.0075805>

LI, B.; WEBSTER, T. J. Bacteria Antibiotic Resistance: New Challenges and Opportunities for Implant-Associated Orthopaedic Infections. **J Orthop Res.**, v. 36, n. 1, p. 22–32, Jan. 2018.

<https://doi:10.1002/jor.23656>

LI, J. et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **Lancet Infect Dis.**, v. 6, p. 589-601, Set. 2006.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70580-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70580-1)

LISBOA, T. et al. Prevalência de Infecção Nosocomial em Unidades de Terapia Intensiva do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 19, p. 414-20, 2007.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-507X2007000400002>

LOMONACO, S. Resistome of carbapenem- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **PLoS One**, v. 13, n. 6, p. e0198526, Jun. 2018.

[https://doi: 10.1371/journal.pone.0198526](https://doi:10.1371/journal.pone.0198526)

LORESTANI, R. C. et al. Gene cassettes of class I integron-associated with antimicrobial resistance in isolates of *Citrobacter* spp. with multidrug resistance. **Iran J Microbiol.**, v. 10, n. 1, p. 22–29, Fev. 2018.

MADEC, J. Y. et al. Extended-spectrum β -lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in animals: a threat for humans? **Clinical Microbiology and Infection**, v. pii:S1198-743X, n. 17, p. 30046-0, Nov. 2017.

[https://doi:10.1016/j.cmi.2017.01.013.](https://doi:10.1016/j.cmi.2017.01.013)

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, Mar. 2012.

<https://doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-9, Jan 2001.

MANAGEIRO, V. et al. Molecular Epidemiology and Risk Factors of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Isolates in Portuguese Hospitals: Results From European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE). **Front Microbiol.**, v. 27, n. 9, p. 2834, Nov. 2018.

[https://doi: 10.3389/fmicb.2018.02834](https://doi:10.3389/fmicb.2018.02834)

MANGAT, C. S. et al. A Novel Hybrid Plasmid Carrying Multiple Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Salmonella enterica* Serovar Dublin. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 24, n. 61(6), p. pii: e02601-16, Mai. 2017.

[https:// doi: 10.1128/AAC.02601-16](https://doi:10.1128/AAC.02601-16)

MANGES, A. R. Editorial Commentary: Genomic Epidemiology: Revealing Hidden Reservoirs for *Klebsiella pneumoniae*. **Clin Infect Dis.**, v. 15, n. 61(6), p. 900–902, Set. 2015.

<https://doi: 10.1093/cid/civ433>

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

<https://doi: 10.3389/fcimb.2018.00004>

MASLIKOWSKA, J. A. et al. Impact of infection with extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella* species on outcome and hospitalization costs. **J Hosp Infect.**, v. 92, n. 1, p. 33-41, Jan. 2016.

<https://doi: 10.1016/j.jhin.2015.10.001>

MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. **Clin Microbiol Rev.**, v. 28, n. 3, p. 565-91, Jul. 2015.

<https://doi: 10.1128/CMR.00116-14>

MATHERS, A. J. et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing *K. pneumoniae* at a Single Institution: Insights into Endemicity from Whole-Genome Sequencing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, n.3, p.1656-1663, Mar. 2015.

<https://doi: 10.1128/AAC.04292-14>

MAZEL, D. Integrins: agents of bacterial evolution. **Nat Rev Microbiol.**, v. 4, n. 8, p. 608-20, Ago. 2006.

<https://doi: 10.1038/nrmicro1462>

MENDES, R. E. et al. C. Metallo- β -lactamases. **Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 42, n. 2, p.103-113, Abr. 2006.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442006000200007>

MEYER, E. et al. Design of a Surveillance System of Antibiotic Use and Bacterial Resistance in German Intensive Care Units (SARI). **Infection**, v. 47, p. 208±215, Ago. 2003.

MONTE, D. F. et al. Chicken Meat as a Reservoir of Colistin-Resistant *Escherichia coli* Strains Carrying *mcr-1* Genes in South America. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 24, n. 61(5), Abr. 2017.

<https://doi:10.1128/AAC.02718-16>

MONTEIRO, J. et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 53, n. 1, p. 333-4, Jan. 2009.

<https://doi: 10.1128/AAC.00736-08>

MOREIRA, M. R. et al. Antimicrobial use, incidence, etiology and resistance patterns in bacteria causing ventilator-associated pneumonia in a clinical-surgical intensive care unit. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 39-44, Fev. 2013.

<http://dx.doi.org/10.1590/0037-868216722013>

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol Spectr.**, v. 4, n. 2, Out. 2016.

<https://doi: 10.1128/microbiolspec>

MUNOZ-PRICE, L. S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infect Dis.**, v. 13, p. 785–796, Set. 2013.

[https://doi:10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](https://doi:10.1016/S1473-3099(13)70190-7)

MURPHY, C. N. et al. Role of *Klebsiella pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae in Colonizing Silicone Tubes Implanted into the Bladders of Mice as a Model of Catheter-Associated Urinary Tract Infections. **Infect Immun.**, v. 81, n. 8, p. 3009–3017, Ago. 2013.

<https://doi: 10.1128/IAI.00348-13>

NA, X. L. et al. Impact of Wastewater Treatment on the Prevalence of Integrons and the Genetic Diversity of Integron Gene Cassettes. **Appl Environ Microbiol.**, v. 16, n. 84(9), p. pii: e02766-17, Abr. 2018.

<https://doi:10.1128/AEM.02766-17>

NAAS, T. et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla_{KPC}* gene. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 52, n. 4, p. 1257-63, Abr. 2008.

<https://doi:10.1128/AAC.01451-07>

NAAS, T.; DORTET, L.; IORGA, B. I. Structural and functional aspects of class A carbapenemases. **Curr. Drug Targets**, v. 17, p. 1006–1028, 2016.

<https://doi:10.2174/1389450117666160310144501>

NANGINO, G. O. et al. Financial impact of nosocomial infections in the intensive care units of a charitable hospital in Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 357-361, Dez. 2012.

<https://doi:10.1590/S0103-507X2012000400011>

NAPARSTEK, L. et al. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother.**, v. 69, n. 4, p. 1027-34, Abr. 2014.

<https://doi:10.1093/jac/dkt487>

NNIS, NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM. Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. **Am J Infect Control.**, v. 32, p. 470-485, Dez. 2004.

<https://doi:10.1016/S0196655304005425>

NAVES, Z. V. F. et al. Rapid dissemination of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* single clone in several hospitals in Great São Paulo, Brazil. In: **Congress of European Microbiologists**, 4th, 2011, Geneva. Abstract.

NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. fux013, n. 41, p. 252–275, Mai. 2017.

<https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>

NEJAD, S. B. et al. Health-care-associated infection in Africa: a systematic review. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 89, p. 757–765, Out. 2011.

<https://doi.org/10.2471/BLT.11.088179>

NOGUEIRA JUNIOR, C. et al. Characterization of epidemiological surveillance systems for healthcare-associated infections (HAI) in the world and challenges for Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p. 11-20, Jan. 2014.

<http://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00044113>

NOLL, N. et al. Resolving structural diversity of Carbapenemase-producing gram-negative bacteria using single molecule sequencing. **bioRxiv** preprint first posted online Out. 2018.

<http://dx.doi.org/10.1101/456897>.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Front Microbiol.**, v. 5, p. 643, Nov. 2014.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>

OLIVEIRA, F. A. et al. MCR-1-positive colistin-resistant *Escherichia coli* in immunocompromised hospitalised patients. **Int J Antimicrob Agents**, v. 52, n. 3, p. 438-440, Set. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.06.011>

ORLEK, A. et al. Plasmid Classification in an Era of Whole-Genome Sequencing: Application in Studies of Antibiotic Resistance Epidemiology. **Front Microbiol.**, v. 9, n. 8, p. 182, Fev. 2017.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00182>

PACE, F. et al. The type VI secretion system plays a role in type 1 fimbria expression and pathogenesis of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infect Immun.**, v. 78, n. 12, p. 4990-8, Dez. 2010.

<https://doi: 10.1128/IAI.00531-10>

PACZOSA, M. K.; MECSAS, A. J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, p. 629–661, Jun. 2016.

<https://doi: 10.1128/MMBR.00078-15>

PADOVEZE, M. C. et al. Surveillance programme for health care associated infections in the state of São Paulo, Brazil. Implementation and the first three years' results. **The Journal of Hospital Infection**, New York, v. 76, n. 4, p. 311-315, Dec. 2010.

<https://doi:10.1016/j.jhin.2010.07.005>

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 48, n. 6, p. 996-1001, Dez. 2014.

<https://doi:10.1016/j.jhin.2007.07.007>

PALZKILL, T. Structural and Mechanistic Basis for Extended-Spectrum Drug-Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM, CTX-M, and KPC β -lactamases. **Front Mol Biosci.**, v. 23, n. 5, p. 16, Fev. 2018.

<https://doi: 10.3389/fmolb.2018.00016>

PAN, Y. J. et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. **Sci Rep.**, v. 23, n. 5, p. 15573, Out. 2015.

<https://doi: 10.1038/srep15573>

PARTRIDGE, S. R. et al. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. **Clin Microbiol Ver.**, v. 31, n. 4, p. e00088-17, Ago. 2018.

<https://doi: 10.1128/CMR.00088-17>

PASKOVA, V. et al. Characterization of NDM-Encoding Plasmids From Enterobacteriaceae Recovered From Czech Hospitals. **Front Microbiol.**, v. 9, p. 1549, Jul. 2018.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01549>

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clin Microbiol Rev.**, v. 18, n. 4, p. 657-86, Oct. 2005.

<https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>

PATOLIA, S. et al. Risk factors and outcomes for multidrug-resistant Gram-negative bacilli bacteremia. **Ther Adv Infect Dis.**, v. 5, n. 1, p. 11-18, Jan. 2018.

<https://doi.org/10.1177/2049936117727497>

PATRICK, D. M. et al. Per Capita Antibiotic Consumption: How Does a North American Jurisdiction Compare with Europe? **Per Capita Antibiotic Consumption**, v. 39, p. 11-17, Jul. 2004.

<https://doi.org/10.1086/420825>

PAVEZ, M. et al. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2702, Jun. 2009.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00089-09>

PECORA, N. D. et al. Genomically informed surveillance for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a health care system. **mBio**, v. 6, p. e01030, Jul. 2015.

<https://doi.org/10.1128/mBio.01030-15>

PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. **Int J Antimicrob Agents** v. 35, n. 4, p. 316-21, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.003>

PERCIVAL, S. L. et al. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 323–334, Abr. 2015.

[https:// doi: 10.1099/jmm.0.000032](https://doi.org/10.1099/jmm.0.000032)

PEREIRA, G. H. et al. Spread of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in São Paulo. **Bras J Hosp Infect.**, v. 79, p. 182-183, Out. 2011.

[https://doi:10.1016/j.jhin.2011.05.023](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.05.023)

PEREIRA, P. S. et al. Clonal Dissemination of OXA-370-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, n.8, p.4453–4456, Mai. 2015.

[https:// doi: 10.1128/AAC.04243-14](https://doi.org/10.1128/AAC.04243-14)

PEREIRA, P. S. et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **J Antimicrob Chemother.**, v. 68, n. 2, p. 312-6, Fev. 2013.

[https://doi:10.1093/jac/dks396](https://doi.org/10.1093/jac/dks396)

PÉREZ-CHAPARRO, P. J. et al. Complete nucleotide sequences of two *bla*_{KPC-2}-bearing IncN Plasmids isolated from sequence type 442 *Klebsiella pneumoniae* clinical strains four years apart. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 58, p. 2958 –2960, Mai. 2014.

[https:// doi: 10.1128/AAC.02341-13](https://doi.org/10.1128/AAC.02341-13)

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. **Infect Genet Evol.**, v. 16, p. 38-53, Jun. 2013.

[https:// doi: 10.1016/j.meegid.2013.01.009](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.01.009)

PITOUT, J. D. et al. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. **J Antimicrob Chemother.** v. 56, n. 1, p. 52-9, Jul. 2005.

[https://doi:10.1086/508877](https://doi.org/10.1086/508877)

PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **Lancet Infect Dis.** v. 8, n. 3, p.159-66, Mar. 2008.

[https://doi:10.1016/S1473-3099\(08\)70041-0](https://doi:10.1016/S1473-3099(08)70041-0)

PITOUT, J. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59, n. 10, p. 5873-84, Out. 2015.

<https://doi:10.1128/AAC.01019-15>. Epub 2015 Jul 13

PITTET, D. et al. Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. **The Journal of Hospital Infection**, New York, v. 68, n. 4, p. 285-292, Apr. 2008.

<https://doi:10.1016/j.jhin.2007.12.013>

POIREL, L. et al. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2420-2424, Jun. 2010.

<https://doi:10.1128/AAC.01456-09>

POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. **Clin Microbiol Rev.**, v. 30, n. 2, p. 557-596, Abr. 2017.

<https://doi:10.1128/CMR.00064-16>

PORTO, J. P. et al. Active surveillance to determine the impact of methicillin resistance on mortality in patients with bacteremia and influences of the use of antibiotics on the development of MRSA infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p.713-718, Nov. 2013.

<https://doi:10.1590/0037-8682-0199-2013>

PRADE, S. S. et al. Estudo brasileiro da magnitude das infecções hospitalares em hospitais terciários. **Revista do Controle de Infecção Hospitalar**, [s. l.], v. 2, p. 11-24, 1995.

QUAINOO, S. Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. **Clin Microbiol Rev.**, v. 30, n. 4, p. 1015-1063, Out. 2017.

<https://doi: 10.1128/CMR.00016-17>.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440-58, Jul. 2007.

<https://doi:10.1128/CMR.00001-07>

RAHMAN, U. R. et al. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. **Biomed Res Int.**, v. 26, n. 2018, p. 9519718, Mar. 2018.

<https://doi: 10.1155/2018/9519718>

RAMIREZ, M. S. et al. Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-negatives: the *Klebsiella pneumoniae* Paradigm. **Microbiol Spectr.**, v. 2, n. 5, p. 1-15, Fev. 2015.

<https://doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0016-2013>

RAMOS, P. I. et al. Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. **BMC Genomics**, v. 15, p. 54, Jan. 2014.

<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-54>

REVEZ, J. Survey on the Use of Whole-Genome Sequencing for Infectious Diseases Surveillance: Rapid Expansion of European National Capacities, 2015-2016. **Front Public Health**. v.18, n. 5, p. 347, Dez. 2017.

<https://doi: 10.3389/fpubh.2017.00347>

RICHARDS, M. J. et al. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 21, p. 510-5, Ago. 2000.

<http://dx.doi.org/10.1086/501795>

RIZEK, C. et al. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, v. 2, n. 13, p. 43, Set. 2014.

<https://doi: 10.1186/s12941-014-0043-3>

ROCHA, F. R.; PINTO, V. P.; BARBOSA, F. C. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microb Drug Resist.** v. 22, n. 4, p. 301-11, 2016.

<https://doi: 10.1089/mdr.2015.0180>

ROSENTHAL, V. D. et al. Device-associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 145, n. 8 p. 582-591, Out. 2006.

<https://doi.org/10.7326/0003-4819-145-8-200610170-00007>

ROSENTHAL, V. D. et al. International nosocomial infection control consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. **American Journal of Infection Control**, St. Louis, v. 38, n. 2, p: 95-104, Mar. 2010.

<https://doi:10.1016/j.ajic.2009.12.004>

ROWE-MAGNUS, D. A. Integrase-directed recovery of functional genes from genomic libraries. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 17, p. e118, Set. 2009.

<https://doi: 10.1093/nar/gkp561>

RUI, Y. et al. Integrins and insertion sequence common region 1 (ISCR1) of carbapenem-non-susceptible Gram-negative bacilli in fecal specimens from 5000 patients in southern China. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 52, n. 5, p. 571-576, Nov. 2018.

[https:// doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.06.015](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.06.015)

RUIZ-GARBAJOSA, P. et al. Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 11, p. 2487-92, Nov. 2013.

[https:// doi:10.1093/jac/dkt237](https://doi.org/10.1093/jac/dkt237)

SABAT, A. J. et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Euro Surveillance**, v. 18, n. 4, p. 1-15, 2013.

SAN MILLAN, A. et al. Small-plasmid-mediated antibiotic resistance is enhanced by increases in plasmid copy number and bacterial fitness. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59, n. 6, p. 3335-41, 2015.

[https:// doi: 10.1128/AAC.00235-15](https://doi.org/10.1128/AAC.00235-15)

SANTOS, C. et al. A novel complex class 1 integron found in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Portugal. **Clin Microbiol Infect.**, v. 17, n. 7, p. 1036-9, Jul. 2011.

[https:// doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03416.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03416.x)

SCHERBAUM, M. et al. Incidence, pathogens and resistance patterns of nosocomial infections at a rural hospital in Gabon. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 14, p. 124, 2014.

[https://doi: 10.1186/1471-2334-14-124](https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-124)

SEKIGUCHI, J. et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 52, n. 11, p. 4194-7, Nov. 2008.

[https:// doi:10.1128/AAC.01337-07](https://doi.org/10.1128/AAC.01337-07)

SELLERA, F. P. et al. *Escherichia coli* carrying IncX4 plasmid-mediated *mcr-1* and *bla*_{CTX-M} genes in infected migratory *Magellanic penguins* (*Spheniscus magellanicus*). **J Antimicrob Chemother.**, v. 1, n. 72(4), p.1255-1256, Abr. 2017.

[https://doi: 10.1093/jac/dkw543](https://doi.org/10.1093/jac/dkw543)

SHANKAR, C. et al. Whole genome analysis of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates from community and hospital acquired bloodstream infection. **BMC Microbiol.**, v. 18, n. 6, Jan. 2018.

[https://doi: 10.1186/s12866-017-1148-6](https://doi.org/10.1186/s12866-017-1148-6)

SHANMUGAM, P.; MEENAKSHISUNDARAM, J.; JAYARAMAN, P. *bla*_{KPC} gene Detection in Clinical Isolates of Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae in a Tertiary Care Hospital. **J Clin Diagn Res.**, v. 7, n. 12, p. 2736–2738, Dez. 2013.

[https:// doi:10.7860/JCDR/2013/7759.3747](https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/7759.3747)

SHANTHI, M. et al. Oxa-181 Beta Lactamase is not a Major Mediator of Carbapenem Resistance in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.7, n.9, p.1986-1988, Set. 2013.

[https:// doi:10.7860/JCDR/2013/5884.3379](https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5884.3379)

SHEN, D. et al. Emergence of a Multidrug-Resistant Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 23 Strain with a Rare *bla*_{CTX-M-24}-Harboring Virulence Plasmid. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 26, n. 63(3), p. pii: e02273-18, Fev. 2019.

[https:// doi: 10.1128/AAC.02273-18](https://doi.org/10.1128/AAC.02273-18)

SHEN, P. et al. Characterization of the genetic environment of the *bla*_{KPC-2} gene among *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Chinese Hospital. **Braz J Infect Dis.**, v. 20, n. 4, p. 384-8, Jul. 2016.

[https:// doi: 10.1016/j.bjid.2016.04.003](https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.04.003)

SHEN, P. et al. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 53, p. 4333–4338, Out. 2009.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00260-09>

SILVA, E. et al. Prevalence and outcomes of infections in Brazilian ICUs: a subanalysis of EPIC II study. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 24, p. 143-150, Jun. 2012.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-507X2012000200008>

SNITKIN, E. S. et al. Tracking a Hospital Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Whole-Genome Sequencing. **Sci Transl Med.**, v.4, n.148, p.48ra116, Ago. 2012.

<https://doi: 10.1126/scitranslmed.3004129>

STALDER, T. et al. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. **Front Microbiol.**, v. 9, n. 3, p. 119, Abr. 2012.

<https://doi: 10.3389/fmicb.2012.00119>

STARLING, C. E.; COUTO, B. R.; PINHEIRO, S. M. Applying the Centers for Disease Control and prevention and National Nosocomial Surveillance system methods in Brazilian hospitals. **American Journal of Infection Control**, St. Louis, v. 25, n. 4, p. 303-311, Aug. 1997.

[https://doi.org/10.1016/S0196-6553\(97\)90022-5](https://doi.org/10.1016/S0196-6553(97)90022-5)

STOESSER, N. et al. Genomic epidemiology of global *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Escherichia coli*. **Sci Rep.**, v. 19, n. 7(1), p. 5917, Jul. 2017.

<https://doi: 10.1038/s41598-017-06256-2>

STRUVE, C.; BOJER, M.; KROGFELT, K. A. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Type 1 Fimbriae by Detection of Phase Variation during Colonization and Infection and Impact on Virulence. **Infect Immun.** v. 76, n. 9, p. 4055–4065, Set. 2008.

<https://doi: 10.1128/IAI.00494-08>

SUN, J. et al. Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. **Trends Microbiol.**, v. 26, n. 9, p. 794-808, Set. 2018.

<https://doi: 10.1016/j.tim.2018.02.006>

TABRIZI, A. M. A. et al. Outbreak of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* harboring *bla*_{VIM-2} among mechanically-ventilated drug-poisoning patients with high mortality in Iran. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 15, p. 93-98, Dez. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.06.020>

TACCONELLI, E. et al. Surveillance for control of antimicrobial resistance. **Lancet Infect Dis.**, v. 18, n. 3, p. e99-e106, Mar. 2018.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30485-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30485-1)

TAMMA, P. D.; RODRIGUEZ-BANO, J. The Use of Noncarbapenem β -Lactams for the Treatment of Extended-Spectrum β -Lactamase Infections. **Clin Infect Dis.** 2017 v. 1, n.64(7), p 972-980, Abr. 2017.

<https://doi.org/10.1093/cid/cix034>

TANGCHAROENSATHIEN, V. et al. Complex determinants of inappropriate use of antibiotics. **Bull World Health Organ.**, v. 1, n. 96(2), p. 141–144, Fev. 2018.

<https://doi.org/10.2471/BLT.17.199687>

TANWAR, J. et al. Multidrug resistance: an emerging crisis. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, Cairo, p. 1–7, Jul. 2014.

<https://doi.org/10.1155/2014/541340>

TOLENTINO, F. M. et al. Endemicity of the High-Risk Clone *Klebsiella pneumoniae* ST340 Coproducing QnrB, CTX-M-15, and KPC-2 in a Brazilian Hospital. **Microb Drug Resist.**, v. 13, Dez. 2018.

<https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0006>

TRILLA, A. Epidemiology of nosocomial infections in adult intensive care units. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v. 20, p. 1-4, Jul. 1994. Suppl. 3.

<https://doi.org/10.1007/BF01745243>

TSAY, R. W. et al. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. **Arch Intern Med.**, v. 13, n. 162(9), p. 1021-7, Mai. 2002.

VAN BELKUM, A. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clin Microbiol Infect.** v. 13, n. 3, p. 1-46, Out. 2007.

<https://doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x>

VAN BOXTEL, R. et al. Acquisition of Carbapenem Resistance by Plasmid-Encoded-AmpC-Expressing *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 27, n. 61(1), p. pii: e01413-16, Dez. 2016.

<https://doi:10.1128/AAC.01413-16>

VAN DUIN, D.; DOI, Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Virulence**, v. 19, n. 8(4), p. 460-469, Mai. 2017.

<https://doi:10.1080/21505594.2016.1222343>

VICKERY, K. et al. A review of bacterial biofilms and their role in device associated infection. **Healthcare Infection**, v. 18, n.2, p. 61–66, Jun. 2013.

<http://dx.doi.org/10.1071/HI12059>

VINCENT, J. L. et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 302, n. 21, p. 2323-2329, Dec. 2009.

<https://doi:10.1001/jama.2009.1754>

von WINTERSDORFF, C. J. H. et al. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 173, Fev. 2016.

<https://doi:10.3389/fmicb.2016.00173>

WADE, C. H.; ELLIOTT, K. R. Preferences for the provision of whole genome sequencing services among young adults. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0174131, Mar. 2017.

<https://doi: 10.1371/journal.pone.0174131>

WALASZEK M. et al. Epidemiology of healthcare-associated infections in Polish intensive care. A multicenter study based on active surveillance. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.**, v. 162, n. 3, p. 190-197, Set. 2018.

<https://doi: 10.5507/bp.2018.006>

WALSH, T. R. et al. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? **Clin Microbiol Rev.**, v. 18, n. 2, p. 306-25, Abr. 2005.

<https://doi:10.1128/CMR.18.2.306-325.2005>

WANG, R. et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1179, Mar. 2019.

<https://doi: 10.1038/s41467-018-03205-z>

WANG, X. et al. Whole-Genome-Sequencing characterization of bloodstream infection-causing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* of capsular serotype K2 and ST374. **Virulence**, v. 1, n. 9(1), p. 510-521, Jan. 2018.

<https://doi: 10.1080/21505594.2017.1421894>

WATANABE, T.; FUKASAWA, T. Episome mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. **J Bacteriol.**, v. 81, n. 5, p. 669–678, Mai. 1960.

WHITE, R. L. et al. Assessment of the Relationship between Antimicrobial Usage and Susceptibility: Differences between the Hospital and Specific Patient-Care Areas. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 16–23, Jul. 2000.

<https://doi.org/10.1086/313916>

WILSON, B. R. et al. Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. **Trends Mol Med.**, v. 22, n. 12, p. 1077-1090, Dez. 2016.

<https://doi: 10.1016/j.molmed.2016.10.005>

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **First regional workshop on patient safety**, New Delhi, 2007.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Technical paper Infection prevention and control in health care: time for collaborative action**. Challenges: WHO, 2010.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global action plan on antimicrobial resistance**. 2015. Disponível em <http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf>. Acesso em: Mar. 2019.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance**. 2018. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: Mar. 2019.

WU, H. et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **Int J Oral Sci.**, v. 7, n. 1, p. 1–7, Mar. 2015.

[https:// doi: 10.1038/ijos.2014.65](https://doi: 10.1038/ijos.2014.65)

WU, K. et al. Class 1 integron gene cassettes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 40, n. 3, p. 264-7, Set. 2012.

[https:// doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.05.017](https://doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.05.017)

YALCIN, A. N. Socio economic burden of nosocomial infections. **Indian Journal of Medical Sciences**, Bombay, v. 57, n. 10, p. 450-456, Oct. 2003.

YANG, D.; ZHANG, Z. Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum beta-lactamases. **J Hosp Infect.**, v. 68, n. 4, p. 369–371, Abr. 2008.

[https:// doi: 10.1016/j.jhin.2008.02.001](https://doi: 10.1016/j.jhin.2008.02.001)

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151-61, Abr. 2001.

[https:// doi:10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001](https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001)

YONG, D. et al. A novel sub group metallo- β -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia, abstr. C1-593. Abstr. 47th **Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)**, 2007.

YONG, D. et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, Dez. 2009.

[https:// doi: 10.1128/AAC.00774-09](https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09)

ZAMAN, S. et al. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. **Cureus**, v. 9, n. 6, p. e1403, Jun. 2017.

[https://doi: 10.7759/cureus.1403](https://doi.org/10.7759/cureus.1403)

ZETNER, A. et al. Plasmid Profiler: Comparative Analysis of Plasmid Content in WGS Data. **bioRxiv** preprint first posted online, Mar. 2017.

<https://doi.org/10.1101/121350>

ZHAO, F. et al. Sequencing and Genetic Variation of Multidrug Resistance Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p. e10141, Abr. 2010.

[https:// doi:10.1371/journal.pone.0010141.](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010141)

ZHENG, J. et al. Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia Strains Was Found to be Associated with CC23 and the Presence of *wcaG*. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 8, p. 21, Fev. 2018.

[https://doi: 10.3389/fcimb.2018.00021](https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00021)

Capítulo II

Hypervirulence and biofilm production in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil

Artigo publicado no periódico Journal of Medical Microbiology em 2018 (doi: 10.1099/jmm.0.000711).

Title: Hypervirulence and biofilm-production in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil

Running title: Hypervirulence and biofilm-production

Author's names: Bruna Fuga Araújo^a, Melina Lorraine Ferreira^a, Paola Amaral de Campos^a, Sabrina Royer^a, Iara Rossi Gonçalves^a, Deivid William da Fonseca Batistão^b, Miriam Rodriguez Fernandes^c, Louise Teixeira Cerdeira^c, Cristiane Silveira de Brito^a, Nilton Lincopan^c, Paulo Pinto Gontijo-Filho^a, Rosineide Marques Ribas^{a*}

Institutional affiliations:

^aInstitute of Biomedical Sciences (ICBIM), Laboratory of Molecular Microbiology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. ^bSchool of Medicine, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. ^cDepartment of Clinical Analysis, School of Pharmacy, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

*Corresponding author:

E-mail: rmribas@ufu.br (Ribas, RM)

Tel.: +55 34 32258574

Present Address: Laboratório de Microbiologia - Instituto de Ciências Biomédicas, Av. Amazonas, S/N, Bloco 2B, Sala 214 (Piso Superior), Campus Umuarama, CEP/Zip Code: 38400-902. Uberlândia – MG, Brazil.

Sequence accession numbers: NTHT000000000, NTGK000000000, NTGJ000000000, NTHU000000000, NTCW000000000, NTHV000000000, NTHW000000000, NTHX000000000, NTHY000000000 and NIRG000000000.

Abstract

In this study, we described the frequency of virulence genes in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC-KP), including hypervirulent (hv) and hypermucoviscous (hm) strains by whole-genome sequencing; also evaluated the capacity of biofilm formation by phenotypic techniques. The occurrence of several virulence genes (*fimABCDEFGHJK*, *mrkABCFHJ*, *ecpA*, *wabG*, *entB*, *ugE*, *irp1*, *irp2*, *traT*, *iutA* and *ureADE*) and high frequency of hvhmKPC-KP isolates were reported. Most of hospital-associated lineages of KPC-KP belonging to the international clonal group 258. Biofilm formation was a constant feature among 90.9% of KPC-KP strains. This report suggests a close relationship between ST437 and weak biofilm production, since all weakly biofilm-producing strains belonged to this sequence type, also supports the dissemination of KPC-KP containing numerous virulence determinants belonging to the CG258-producing biofilms in Brazil, including hypervirulent and hypermucoviscous strains. These factors make this pathogen successful at causing infections, leading to its rapid expansion and persistence in hospital settings.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; biofilm; KPC-2; WGS; hypervirulence.

Klebsiella pneumoniae carbapenemase-2-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC-KP) isolates has become one of the most important pathogens recently [1]. Despite its prevalence is advancing worldwide, this phenotype has become a major public health problem, especially in endemic areas in lower and middle-income countries [2,3].

Recently, there has been great concern over the emergence of hypervirulent (hv) and hypermucoviscous (hm) KPC-KP (hvhmKPC-KP) strains due their association with serious infections, in addition to the ability to carry several genes of virulence and resistance that represent major threats [4,5,6].

In this report, we investigated the prevalence of hvhmKPC-KP isolates obtained from different regions of Brazil and described the molecular characteristics of virulence by whole-genome sequencing. Additionally, the biofilm production was evaluated by phenotypic techniques.

In 2016, a total of 33 carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains were obtained from various specimens of patients hospitalized in northeast, center-west, southeast and south of Brazil. These isolates were identified as *K. pneumoniae* in their place of origin and the species were confirmed in the Laboratory of Molecular Microbiology at the Federal University of Uberlandia, Brazil.

The presence of *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GES}, and *bla*_{NDM} genes was evaluated by polymerase chain reaction (PCR), and are further described in supplementary table 1. A total of 11 KPC-KP were tested for phenotypic identification of hvhmKPC-KP, biofilm production and whole-genome sequencing (WGS). These isolates were selected in order to contemplate different cities and states of Brazil.

The phenotypic identification of hmKPC-KP was determined by the formation of a viscous filament ≥ 5 mm after stretching a *K. pneumoniae* colony with a loop on an agar plate (string test) [5]. The hmhvKPC-KP strains were defined when there were at least two of the following indicators: a positive string test, amplification of the *rmpA* gene, and/or amplification of the aerobactin gene [5].

The total genomic DNA of selected strains was sequenced, using an Illumina NextSeq 500 sequencer (Illumina, San Diego, CA), and the sequence reads were *de novo* assembled using Velvet pipeline version 5.0.1 and Geneious version 9.1.8. The pairwise alignment was performed by BLASTn homology searches (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), and an *in silico* comparative analysis, including microbial identification, detection of virulence genes

(*fimABCDEFGHJK*, *mrkABCDEFHJ*, *ureADEG*, *iucABC/iutA*, *allABCDS*, *kfuABC*, *ecpABC* gene clusters, and *rmpA*, *rmpB*, *wabG*, *ugE*, *entB*, *traT*, *iroB*, *iroC*, *iroD*, *iroN*, *irp1*, *irp2*, *pdl1* genes) and antimicrobial genotypes, using the Center for Genomic Epidemiology (CGE) pipelines.

Investigation of biofilm was performed according to protocol established by Cassat *et al.* [7] with modifications performed by Campos *et al.* [8]. Briefly, the strains were grown for 18h at 37°C with shaking at 120 rpm in 20 ml of tryptic soy broth (TSB) using bacteria grown on tryptic soy agar (TSA) plates. Cells were harvested by centrifugation (6000 rpm, 10 min, 4°C) and suspended in saline (0.9% NaCl prepared in distilled water) at a concentration of approximately 1×10^9 cells/mL, prior to use in biofilm and adhesion assays. *K. pneumoniae* NTUH-K2044 was used as control.

Initial adhesion assays were performed as described below. 200 µl of a cell suspension, containing 1×10^7 cells/mL prepared in TSB, was added to 96-well polystyrene plates for 2h at 37°C with shaking at 120 rpm. The 96-well polystyrene plates were washed twice with a 0.9% NaCl solution and harvested by scraping of wells for 1 minute and 30 seconds. The cell suspension obtained was plated on TSA for colony-forming unit (CFU) enumeration. All experiments were done in quadruplicate, in three independent experiments.

Briefly, 200 µl of a cell suspension containing 1×10^7 cells/mL prepared in TSB was added to 96-well polystyrene plates. Bacteria grown for 24h at 37°C with shaking at 120 rpm in 96-well polystyrene plates were washed twice with a 0.9% NaCl solution and allowed to dry in an inverted position. The total biomass was measured by methanol fixation, crystal violet staining and acetic acid elution. The absorbance for the eluted dye was read on an ELISA plate reader (Polaris® Celer, Brazil) at 570 nm. The experiments were done with eight replicates for each strain, in six independent experiments. TSB without bacteria was used as a negative control. Biofilm production was interpreted according to the criteria of Saxena *et al.* (2014). The optical density cut-off value (OD_c) was established as three standard deviations (SD) above the mean of the optical density (OD) of the negative control: OD_c = average OD of negative control + 3x SD of negative control. For easier interpretation of the results, the strains were divided into the following categories according to their optical densities (OD_i): OD_i ≤ OD_c = non biofilm producer; OD_c < OD_i ≤ 2x OD_c = weak biofilm producer; 2x OD_c < OD_i < 4x OD_c = moderate biofilm producer; 4x OD_c < OD_i = strong biofilm producer.

The biofilm cell number was determined by colony form unit (CFU) enumeration. After biofilm formation, the 96-well polystyrene plates were washed twice with a 0.9% NaCl solution and harvested after scraping the wells for 1 minute and 30 seconds. The cell suspension obtained was plated onto TSA plates. All experiments were done in quadruplicate, on three independent occasions.

To evaluate the ultrastructure of biofilms, Scanning Electron Microscopy (SEM) assay were performed. Two standard glass beads of 0.5 cm diameter were used for each sample, one per well (96-well plates). After biofilm formation, the beads were fixed in glutaraldehyde/paraformaldehyde (2.5%) for 18h at 4°C and washed in PBS solution (pH 7.4) three times. In the sequence, the samples were maintained in osmium tetroxide (1%) for 2h at room temperature and washed again in PBS solution (pH 7.4) three times. The samples were dehydrated in alcohol 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% and 100% (3 times) for 20 minutes each at room temperature and then taken to the drying procedure (critical point). The beads were metallized with 20 nm thickness gold, visualized and photographed using the Scanning Electron Microscope (Zeiss).

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism v.5 (GraphPad Software, San Diego, CA). Quantitative assays were compared using the Kruskal-Wallis test, applying Dunn's multiple comparison test. All tests were performed with a confidence level of 95% and statistical significance was defined as $P < 0.05$.

Overall, from 33 carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains analyzed, 64% (21/33) harbored the *bla*_{KPC} gene and none harbored the *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GES}, or *bla*_{NDM} genes. Among 11 KPC-KP isolates (11/21), two (18.2%) were positive for the string test and were identified as hmKPC-KP (**Table I**). Interestingly, both strains were from blood obtained from different regions of the country, central-west and northeast Brazil.

WGS analysis of 11 KPC-KP strains confirmed the species identification, the presence of the KPC-2 variant, and also revealed four different sequence types (STs) among the strains (ST11, ST340, ST437, and ST443). The predominant ST in Brazil was ST11 (54.5%), followed by ST437 (27.3%), whereas ST340 and ST443 were identified in only one isolate (**Table 1**). One isolate could not be analyzed after sequencing due to data generated by the technique (WGS), which did not allow assembly. The Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession NTHT000000000 (B03 strain), NTGK000000000 (B04 strain), NTGJ000000000 (B05 strain), NTHU000000000 (B11 strain),

NTCW000000000 (B16 strain), NTHV000000000 (B17 strain), NTHW000000000 (B29 strain), NTHX000000000 (B30 strain), NTHY000000000 (B35 strain) and NIRG000000000 (B40 strain).

All strains had in common genes encoding type 1 fimbriae (*fimABCDEFGHJK*), type 3 fimbriae (*mrkABCDHFHJ*), *Escherichia coli* common pilus (*ecpA*), outer core lipopolysaccharide (*wabG*), enterobactin (*entB*), aerobactin (*iutA*), and urease synthesis associated genes (*ureADE*). The virulence genes, *iucABC*, *allABCDRS*, *kfuABC*, *ecpBC*, *rmpA*, *rmpB*, *iroB*, *iroC*, *iroD*, *iroN*, and *pdhI*, were not detected in the strains surveyed (**Table 1**). After analysis of the aerobactin gene, the two strains characterized as hmKPC-KP, were also defined as hvKPC-KP.

All KPC-KP strains assessed were able to adhere to an unmodified polystyrene surface (**Fig. 1a**), and 63.6% (B04, B11, B15, B16, B29, B30, and B35 strains) of strains were able to adhere significantly more compared to the positive control ($P < 0.001$). Regarding the number of cells present on each biofilm, 72% (8/11) of the strains had more significantly higher numbers of cells than the positive control ($P < 0.001$), and only the B04, B05, and B40 strains produced biofilms similar to the control (**Fig. 1b**). Six strains produced more biofilm mass than the control ($P < 0.001$) including the B04 strain, which was classified as a non-biofilm producer (**Fig. 1c**). Quantitatively, seven strains (63.7%) were moderate biofilm producers, three (27.3%) were weak producers, and one strain was a non-biofilm producer (Table 1). Interestingly, all *K. pneumoniae* strains that weakly produced biofilm belonged to ST437. These characteristics were confirmed by scanning electron microscopy images (data not shown).

The potential of KPC-producers to disseminate, together with the difficulty of their detection and control, raises the need to develop appropriate and effective policies to reduce the infection in lower and middle-income countries [9]. In this study, we detected the presence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2-producing *K. pneumoniae*. The prevalence of this subtype in Brazil has been described previously and it is an example of a successful antimicrobial drug resistant determinant; it is one of the most frequently occurring determinants worldwide [10,11].

In addition to the problem of dissemination of KPC in Brazil, KPC-KP ST11 strains are prototypes of a well adapted high-risk clone and have been largely responsible for the global spread of carbapenem resistance [12]. In this report, we performed WGS on a Brazilian

collection of KPC-KP isolates and showed the presence of ST11, closely related to CG258, which is the major clonal group among *K. pneumoniae* harboring the *bla*_{KPC} gene from Latin America [12]. Two other STs, ST340 and ST437, were also evidenced and, according to research, have endemic potential similar to ST11 [13]. ST443 belonging to the unusual CG1345 was also identified, and the literature already shows reports of its appearance in Brazil [14].

Additionally, the literature shows that plasmids containing the *bla*_{KPC} gene are not necessarily associated with increased virulence, and that the isolates belonging to ST11 do not always have greater virulence than other isolates of *K. pneumoniae* [15,16,17]. Despite this, the strains analyzed in this study contained a several amount of virulence genes (*fimABCDEFGHIK*, *mrkABCFHJ*, *ecpA*, *wabG*, *entB*, *ugE*, *irp1*, *irp2*, *traT*, *iutA* and *ureADE*). Recent research has shown that a consequence of these determinants in *K. pneumoniae* strains (mainly capsular type, LPS, adhesins and iron-scavenging system) may be responsible for increasing the virulence potential of these microorganisms causing the development of more invasive diseases [17].

In this study, the prevalence of hvhmKPC-KP isolates was high (18.2%). The virulence and resistance context found in these microorganisms represent a problem for therapy, since these factors increases the conditions for colonization and persistence of highly resistant phenotypes in hospitalized patients [17]. These findings are alarming and lead to great concern, since these strains may be resistant to multiple drugs and may be highly transmissible, which presents an imminent threat to public health [18].

Aggravating this scenario, biofilm-associated infection is very difficult to treat due to high resistance to antibiotics [19]. With the worldwide increase in the occurrence of KPC-KP, data on its ability to form biofilms in nosocomial strains are crucial [20]. Our data indicate that individual *K. pneumoniae* strains had distinct abilities to attach to polystyrene plates and form biofilm. Biofilm formation was a constant feature among 90.9% of all KPC-KP strains. We found that all the isolates that formed significantly more biofilm than control belonged to the ST11 endemic lineage. Interestingly, this study also suggests a close relationship between ST437 and weak biofilm production, since all weakly biofilm-producing strains belonged to this ST. However, there are no data from the literature about the biofilm of *K. pneumoniae* ST437. Due to the lack of data in the literature about the production by ST437 strains, this

study becomes unique because can clarify the biofilm prediction in strains belonging to this ST.

In conclusion, our study described the important association of KPC-2, biofilm formation, and virulence factors in *K. pneumoniae* ST11, an international high-risk clone, besides the detection of infections caused by hvhmKPC-KP strains. Systemic surveillance should focus on the dissemination of this virulent, multidrug-resistant, and biofilm-producing clone in order to provide advantages in relation to this global threat to public health and future related challenges.

Acknowledgments

The authors wish to thank Silvia Dias de Oliveira (Porto Alegre, Brazil), Afonso Luiz Barth (Porto Alegre, Brazil), Maria Márcia Camargo de Moraes (Recife, Brazil), LÍlian Alves Rocha (Brasília, Brazil), Maria Cristina Bronhro Tognim (Maringá, Brazil), Marise Dutra Asensi (Belo Horizonte e Goiânia, Brazil), Maria Celeste Nunes Melo (Natal, Brazil), Albalúcia Maria C. Carvalho (João Pessoa, Brazil), Cláudio Galuppo Diniz (Juiz de Fora, Brazil), Kátia Regina Netto dos Santos (Londrina, Brazil), and Iolanda Alves Braga (Uberaba, Brazil), who kindly provided the strains to this study. The Laboratory of Microscopy of the Faculty of Chemical Engineering of UFU for the technical support. We also thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Funding information

This work was supported by the Brazilian Funding Agency CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais).

Ethical statement

No authorization was required from the Ethics Committee for Human Research of Federal University of Uberlandia, because we used a bacteriological collection from the Laboratory of Molecular Microbiology at the Federal University of Uberlandia, without any contact with the patients and their data.

Conflict of Interests

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Bassetti M, Giacobbe DR, Giamarellou H, Viscoli C, Daikos GL, Dimopoulos G, De Rosa FG, Giamarellos-Bourboulis EJ, Rossolini GM, Righi E, Karaiskos I, Tumbarello M, Nicolau DP, Viale PL, Poulakou G. Management of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Infections. *Clin Microbiol Infect*. 2017; S1198-743X(17)30499-8.
2. Labarca J, Poirel L, Ozdamar M, Turkoglu S, Hakko E, Nordmann P. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, finally targeting Turkey. *New Microbes New Infect*. 2014;2(2):50–51.
3. D’Andrea MM, Marmo P, Angelis LH, Palmieri M, Ciacci N, Lallo G, Demattè E, Vannuccini E, Lupetti P, Rossolini GM, Thaller MC. ϕ BO1E, a newly discovered lytic bacteriophage targeting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of the pandemic Clonal Group 258 clade II lineage. *Sci Rep*. 2017;1;7(1):2614.
4. Diago-Navarro E, Calatayud-Baselga I, Sun D, Khairallah C, Mann I, Ulacia-Hernando A, Sheridan B, Shi M, Friesa BC. Antibody-Based Immunotherapy To Treat and Prevent Infection with Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical and Vaccine Immunology* 2017;24(1):e00456-16.
5. Catalán-Nájera JC, Garza-Ramos U, Barrios-Camacho H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two diferente but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes?. *Virulence* 2017; 8(7):1111-1123.
6. Duina DV, Doi, Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence* 2017; 8(4):460–469.
7. Cassat JE, Semltzer MS, Lee CY. Investigation of biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *MTDS Mol Biol* 2014; 1085:195–211.
8. Campos PA, Royer S, Batistão DWF, Araújo BF, Queiroz LL, Brito CS, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. Multidrug Resistance Related to Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains from Different Pulsotypes. *Curr Microbiol* 2016; 72 (5):617-27.

- 9. Perez F, Villegas MV.** The role of surveillance systems in confronting the global crisis of antibiotic-resistant bacteria. *Curr Opin Infect Dis.* 2015;28(4):375-83. doi: 10.1097/QCO.0000000000000182.
- 10. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP.** Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(9):785-96.
- 11. Ribeiro PCS, Monteiro AS, Marques SG, Monteiro SG, Monteiro-Neto V, Coqueiro MMM, Marques ACG, Turri RJG, Santos SG, Bomfim MRQ.** Phenotypic and molecular detection of the *bla_{KPC}* gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. *BMC Infectious Diseases* 2016;16:737.
- 12. Ocampo AM, Chen L, Cienfuegos AV, Roncancio G, Chavda KD, Kreiswirth BN, Jiménez JN.** A Two-Year Surveillance in Five Colombian Tertiary Care Hospitals Reveals High Frequency of Non-CG258 Clones of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Distinct Clinical Characteristics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;26;60(1):332-42.
- 13. 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). *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 312–316.
- 14. Seki LM, Pereira PS, Souza MPAH, Conceição MS, Marques EA, Porto CO, Colnago EML, Alves CFM, Gomes D, Assef APDAC, Samuelsen Ø, Asensi MD.** Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011;70:274–277.
- 15. Lavigne JP, Cuzon G, Combescure C, Bourg G, Sotto A, Nordmann P.** Virulence of *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring *bla_{KPC-2}* carbapenemase gene in a *Caenorhabditis elegans* model. *PLoS One* 2013;8:e67847.
- 16. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L.** Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):5873-84.

17. Liu Y, Liu PP, Wang LH, Wei DD, Wan LG, Zhang W. Capsular Polysaccharide Types and Virulence-Related Traits of Epidemic KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a Chinese University Hospital. *Microb Drug Resist.* 2017; 23(7):901-907.
18. Gu D, Dong N, Zheng Z, Lin D, Huanf M, Wang L, Chan EW, Shu L, Yu J, Zhang R, Chen S. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2017;S1473-3099(17)30489-9.
19. Lebeaux D, Ghigo J, Beloin C. Biofilm-related infections: Bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014;78(3):510–543.
20. 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*. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:1027–1034.
21. Galetti R. Estudo de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamases e de genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos. 49 f. Master Thesis - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil. 2010.
22. Woodford N. Rapid Characterization of β -lactamases by Multiplex PCR. In: Gillespie SH, Mchugh TD. *Antibiotic Resistance Protocols: Second Edition, Methods in Molecular Biology* 2010; 642: 181-192.
23. Hong SS, Kim K, Huh JY, Jung B, Kang MS, Hong SG. Multiplex PCR for Rapid Detection of Genes Encoding Class A Carbapenemases. *Ann Lab Med.* 2012;32:359-361.
24. Shenoy KJ, Jyoti EK, Rayikumar R. Phenotypic identification & molecular detection of *bla*_{NDM-1} gene in multidrug resistant Gram-negative bacilli in a tertiary care center. *Indian Journal of Medical Research* 2014; 139(4):625–631.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version.

Legend of figures

Figure 1. Evaluation of the number of adhered cells, biomass and biofilm formation in *K. pneumoniae* strains. A) Number of adhered cells onto glass beads plates after 2 h period of contact, expressed by log CFU mL⁻¹. B) Biofilm cellular concentration expressed by log CFU mL⁻¹. C) Biofilm biomass expressed as crystal violet optical density (OD570 nm). Results represent means plus standard deviations (error bars) of three independent experiments. *P0.01, **P0.001, ***P0.0001, using Kruskal–Wallis, Dunn’s multiple comparison test.

Non-standard Abbreviations

KPC-KP: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2-producing *Klebsiella pneumoniae*

hv: hypervirulent

hm: hypermucoviscous

hvhmKPC-KP: hypervirulent and hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2-producing *Klebsiella pneumoniae*

WGS: whole-genome sequencing

CGE: center for genomic epidemiology

TSB: tryptic soy broth

TSA: tryptic soy agar

CFU: colony-forming unit

ODc: optical density cut-off value

OD: optical density

ST: sequence type

Figure 1.

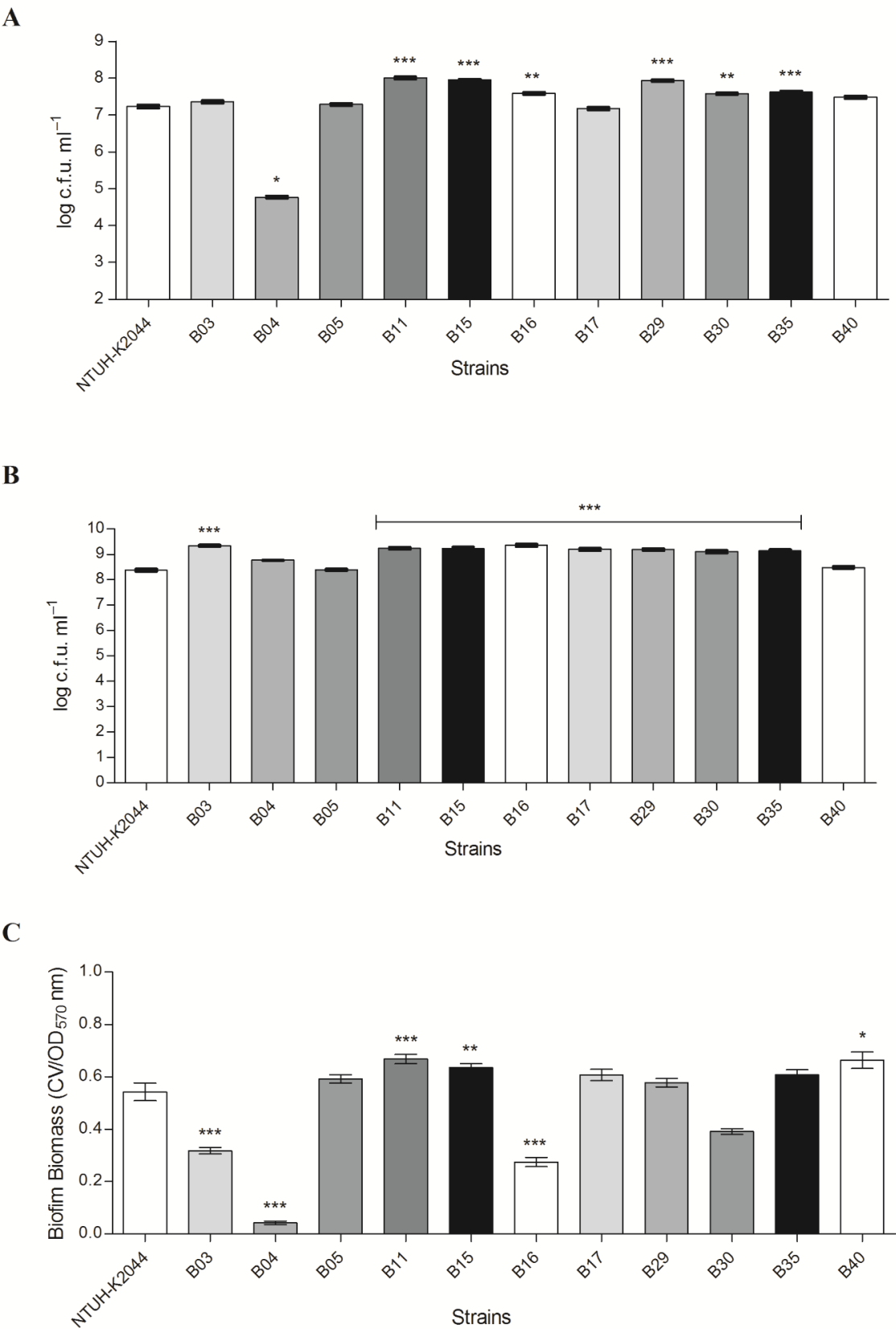


Table 1.KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains used in the study of adhesion and biofilm formation

Strains	Local	Source	Year of isolation	ST ¹	Virulence-associated genes ²												KPC-KP phenotype ³	Mean OD ⁴ value	Biofilm formation
					<i>fim</i> cluster	<i>mrk</i> cluster	<i>mrkE</i>	<i>ecpA</i>	<i>wabG</i>	<i>ureAD</i>	<i>ureEG</i>	<i>ugE</i>	<i>entB</i>	<i>irp1,2</i>	<i>iutA</i>	<i>traT</i>			
B03	Porto Alegre	Blood	2013	437	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	KPC-KP	0.32	Weak
B04	Recife	Blood	2009	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	hmvKPC-KP	0.21	Non-producer
B05	Uberlândia	Rectal swab	2014	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	KPC-KP	0.59	Moderate
B11	Brasília	Blood	2016	11	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	KPC-KP	0.68	Moderate
B16	Belo Horizonte	Peritoneal secretion	2009	437	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	KPC-KP	0.28	Weak
B17	Goiânia	Blood	2010	443	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	hmvKPC-KP	0.61	Moderate
B29	Natal	Urine	2010	340	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	KPC-KP	0.58	Moderate
B30	João Pessoa	Blood	2016	437	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	KPC-KP	0.39	Weak
B35	Uberaba	Blood	2016	11	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	KPC-KP	0.61	Moderate
B40	Uberlândia	Liquor	2015	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	KPC-KP	0.70	Moderate
B15	Maringá	Urine	2016	11	ND ⁵	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.65	Moderate

¹ST: sequence type; ²fim cluster: *fimABCDEFGHIK*, mrk cluster: *mrkABCDFHJ*; ³hmvKPC-KP: hypermucoviscous and hypervirulent; ⁴optical density; ⁵not determined. The virulence genes, *iucABC*, *allABCDRS*, *kfuABC*, *ecpBC*, *rmpAB*, *iroBCDN*, and *pdlI*, were not detected in the strains.

Supplementary table 1. Primer nucleotide sequences and amplicon size of the PCR carried out for the detection of antimicrobial resistance gene in this study

Target gene	Sequence (5'– 3')	Product Size (bp)	Reference
<i>bla</i> _{KPC}	GTATCGCCGTCTAGTTCTGCTG GTTGACGCCCAATCCCTCGA	860	[21]
<i>bla</i> _{IMP}	GAATAGRRTGGCTTAAYTCTC CCAAACYACTASGTTATC	188	[22]
<i>bla</i> _{VIM}	GTTTGGTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	382	[22]
<i>bla</i> _{GES}	GCTTCATTACGCACTATT CGATGCTAGAAACCGCTC	323	[23]
<i>bla</i> _{NDM}	GGGCAGTCGCTTCCAACGGT GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT	475	[24]

Capítulo III

Insights into a novel Tn4401 deletion (Tn4401i) in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical strain belonging to the high-risk clonal group 258 producing KPC-2

Artigo publicado no periódico International Journal of Antimicrobial Agents em 2018 (doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.08.011).

Title: Insights into a novel Tn4401 deletion (Tn4401i) in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical strain belonging to the high-risk Clonal Group 258 producing KPC-2

Bruna Fuga Araújo, Institute of Biomedical Sciences, Laboratory of Molecular Microbiology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil

Sabrina Royer, Institute of Biomedical Sciences, Laboratory of Molecular Microbiology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil

Paola Amaral Campos, Institute of Biomedical Sciences, Laboratory of Molecular Microbiology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil

Melina Lorraine Ferreira, Institute of Biomedical Sciences, Laboratory of Molecular Microbiology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil

Iara Rossi Gonçalves, Institute of Biomedical Sciences, Laboratory of Molecular Microbiology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil

Luiz Gustavo Machado, Institute of Biomedical Sciences, Laboratory of Molecular Microbiology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil

Nilton Lincopan, Departament of Clinical Analysis, School of Pharmacy, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Miriam Rodriguez Fernandes, Departament of Clinical Analysis, School of Pharmacy, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Louise Teixeira Cerdeira, Departament of Clinical Analysis, School of Pharmacy, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Deivid William da Fonseca Batistão, School of Medicine, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil

Paulo P. Gontijo-Filho, Institute of Biomedical Sciences, Laboratory of Molecular Microbiology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil

Rosineide Marques Ribas*, Institute of Biomedical Sciences, Laboratory of Molecular Microbiology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil

Corresponding author

R. M. Ribas

Institute of Biomedical Sciences, Laboratory of Molecular Microbiology

Federal University of Uberlândia, Uberlândia,

Minas Gerais,

Brazil

E-mail address: rosi_ribas@yahoo.com.br

Sir,

In Brazil and other lower- and middle-income countries, the emergence and spread of high-risk clones of CTX-M-15 and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* has been found in clinical settings at increasingly alarming frequencies [1,2]. The potential for global dissemination of the resistance genes in *K. pneumoniae* is of concern because it is related to high-risk clones (i.e. CG258) and the presence of mobilised plasmids carrying Tn4401 [2].

This study aimed to investigate the presence of the Tn4401 transposon and the spread of clinical lineages of MDR KPC-2-producing *K. pneumoniae* isolates belonging to the high-risk clone CG258 in different regions in Brazil.

A total of 33 carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains were recovered from various clinical specimens from patients admitted to different-sized hospitals in four regions of Brazil (Northeast: Natal, João Pessoa, Recife; Centre west: Brasília, Goiânia; Southeast: Uberlândia, Uberaba, Belo Horizonte; and South: Porto Alegre, Maringá). The identification of the species was confirmed in the Laboratory of Molecular Microbiology of the Federal University of Uberlândia. The presence of the *bla*_{KPC} gene was evaluated by Polymerase Chain Reaction (PCR) for all samples, according to the method previously described [3].

Whole genome sequencing (WGS) was carried out on 10 representative strains from ten different cities in Brazil using an Illumina NextSeq 500 sequencer (Illumina, San Diego, CA). Sequence reads were *de novo* assembled using Velvet (version 5.0.1) [4] and Geneious (version R9). This assembly was submitted to NCBI and annotated using Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [5]. *In silico* comparative analyses were performed using the Center for Genomic Epidemiology pipelines (<http://genomicepidemiology.org/>). BLASTn and nucleotide pairwise alignment of Geneious allowed comparisons with previously-published

Tn4401 isoforms (Tn4401a-Tn4401h) [6-10], considering the high coverage of the sequences, and also the analysis of the *bla*_{CTX-M-15} genetic environment. One strain could not be analysed after sequencing as the data generated by the technique (WGS), did not allow assembly. The NCBI accession number previously published [11] of the sequenced strains is shown in the Supplementary Table.

The PCR amplification results revealed 21 distinct KPC-2 strains among the 33 carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates from different regions of Brazil. The ten sequenced KPC-producing *K. pneumoniae* isolates were grouped into four sequence types (STs): ST11 (five isolates), ST437 (three isolates), ST340 (one isolate) and ST443 (one isolate) (Supplementary material). According to the literature, the ST11 is involved in the spread of *K. pneumoniae* [1,12], and in this study this ST was detected in different time periods (since 2009). These high-risk clones were previously linked to the global expansion of different carbapenemases (i.e., *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}) and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) (i.e. *bla*_{CTX-M-15}) [12,13] because they are better adapted in hospital environments and are associated with plasmids [12]. Isolates belonging to ST11, ST437 and ST340 clones coproduced the extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) CTX-M-15 in 70% of strains. *In silico* restriction analysis of the *bla*_{CTX-M}-genetic environment showed identical profiles for all strains, with the *ISEcp1-bla*_{CTX-M-15} element (2971 bp) flanked by a 5-bp target-site duplication and probably inserted within a Tn2-derived sequence.

In this study, although *bla*_{KPC-2} gene was most frequently located on non-Tn4401 elements (NTE_{KPC}), its detection was also evidenced in the Tn4401b isoform, which is still considered the most important epidemiologically related transposon in *K. pneumoniae* [6]. In addition, the genomic study led to the identification of a carbapenem resistant *K. pneumoniae* isolate carrying the *bla*_{KPC-2} gene in a new variant of Tn4401 (Tn4401i, in a sample belonging to clone ST11/CG258, collected from blood and isolated from a hospitalized patient in the southeastern region of Brazil in 2016). The alignment of the sequences of this element revealed the *bla*_{KPC-2} gene flanked by *ISKpn6* downstream and *ISKpn7* upstream, with a 203-bp deletion between this IS and *bla*_{KPC-2} (Figure 1). Structural variation between Tn4401b and the novel Tn4401i isoform, including variation in the putative promoter regions, is also shown in Figure 1. The role of this new Tn4401 isoform in the global dissemination of the *bla*_{KPC-2} gene deserves to be better investigated from this report. Our findings raise important concerns about the possible contribution of this new variant for the dissemination of resistance to

carbapenems, as only a few antibiotic options are still available for appropriate treatment [12]. Therefore, efforts still should focus on implementing effective infection prevention and control measures.

In summary, this study provides further evidence that novel variants of the *Tn4401* element in high-risk clones of KPC-2-producing *K. pneumoniae* can play a key role in the spread of this gene among clinically significant pathogens selected from environments with intense consumption of antibiotics.

Acknowledgments

We are grateful to Silvia Dias Oliveira (Immunology and Microbiology Laboratory, Faculty of Biosciences Pontifical, Catholic University of Rio Grande do Sul), Márcia Maria Camargo Morais (Microbial Resistance Laboratory, University of Pernambuco) and Magna Cristina de Paiva (Federal University of São João del Rei, Dona Lindu Campus, Divinópolis), who kindly provided the control strains to this study. We thank Daise Aparecida Rossi (Applied Animal Biotechnology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine) for the technical support.

Funding: This work was supported by the FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais) and Brazilian Funding Agency CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- [1] Rocha FR, Pinto VPT, Barbosa FCB. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. *Microbial Drug Resistance* 2016; 22(4):301-311.
- [2] Rojas LJ, Weinstock GM, De La Cadena E, Diaz L, Rios R, Hanson BM, Brown JS, Vats P, Phillips DS, Nguyen H, Hujer KM, Correa A, Adams MD, Perez F, Sodergren E, Narechania A, Planet PJ, Villegas MV, Bonomo RA, Arias CA. Na Analysis of the Epidemic of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*: Convergence of two evolutionary mechanisms creates the “Perfect Storm”. *J Infect Dis*. 2017;1:82-92.
- [3] Galetti R. Estudo de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamases e de genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos. Dissertation, Universidade de São Paulo. 2010.
- [4] Zerbino DR. Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. *Curr Protoc Bioinformatics* 2010; Chapter:Unit-11.5.
- [5] Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res*. 2016; 19;44(14):6614–6624.
- [6] Cheruvanky A, Stoesser N, Sheppard AE, Crook DW, Hoffman PS, Weddle E, Carroll J, Sifri CD, Chai W, Barry K, Ramakrishnan G, Mathers AJ. Enhanced *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Expression from a Novel Tn4401 Deletion. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(6):e00025-17.
- [7] Chen L, Chavda KD, Mediavilla JR, Jacobs MR, Levi MH, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Partial excision of *bla_{KPC}* from Tn4401 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:1635–1638.
- [8] Bryant KA, Van Schooneveld TC, Thapa I, Bastola D, Williams LO, Safranek TJ, Hinrichs SH, Rupp ME, Fey PD. KPC-4 is encoded within a truncated Tn4401 in an IncL/M plasmid, pNE1280, isolated from *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:37– 41.
- [9] Pecora ND, Li N, Allard M, Li C, Albano E, Delaney M, Dubois A, Onderdonk AB, Bry L. Genomically informed surveillance for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a health care system. *mBio* 2015;6:e01030.

[10] Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Herda M, Derde LP, Bonten MJ, Adler A, Carmeli Y, Goossens H, Hryniewicz W, Brun-Buisson C, Gniadkowski M; MOSAR WP2, WP3, and WP5 Study Groups. KPC-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae colonizing patients in Europe and Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;60:1912–1917.

[11] Araujo BF, Ferreira ML, Campos PA, Royer S, Gonçalves IR, Batistão DWF, Fernandes MR, Cerdeira LT, Brito CS, Lincopan N, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. Hypervirulence and biofilm production in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil. *Journal of Medical Microbiology* 2018;67(4):523-528.

[12] Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):565-91.

[13] Rodrigues C, Bavlovič J, Machado E, Amorim J, Peixe L, Novais Â. KPC-3-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal Linked to Previously Circulating Non-CG258 Lineages and Uncommon Genetic Platforms (Tn4401d-IncFIA and Tn4401d-IncN). *Front Microbiol.* 2016;28(7):1000.

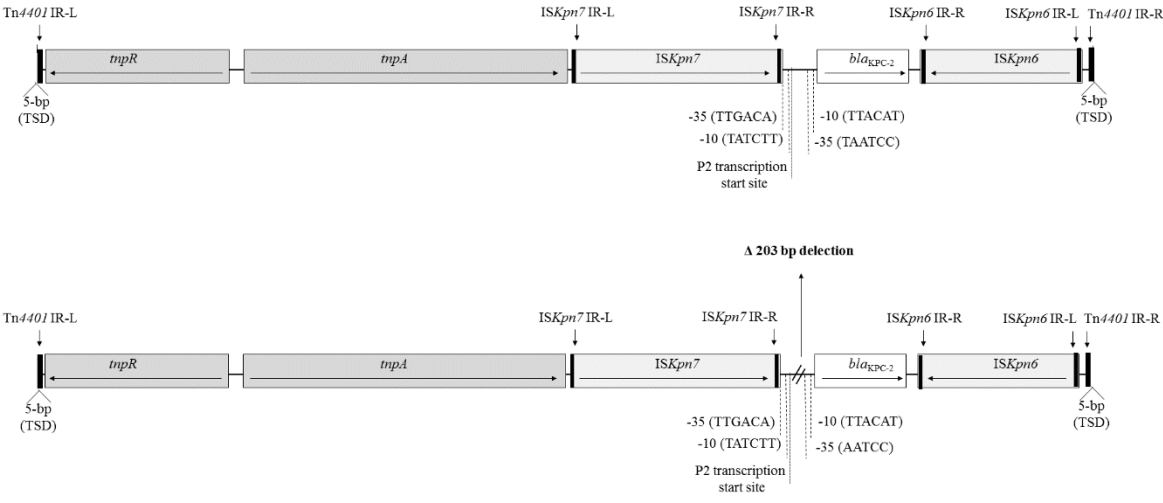
Figure Legends

Fig. 1. Structural variation in Tn4401b transposon (GenBank accession number KX276209) and the novel variant (Tn4401i) (GenBank accession number MH047294), showing a 203-bp deletion between ISKpn7 and *bla*_{KPC-2} gene. Comparative analysis of the alignment of the promoter regions of *bla*_{KPC-2} isoforms with putative promoters was also represented. The -35 and -10 regions are highlight in gray, and the deletion in isoform “i” is underlined.

Figure 1.

Tn4401b
KX276209

Tn4401i
MH047294



	-35	P2	-10	
Tn4401b	GT	TGACACCGGCGTACCCTCGGTGCTATCTTCGCGCCCCAATAGTCGGGGCTTGCCAGGACTTCCTGAGGCCGTCCGTAACG		
Tn4401i	GT	TGACACCGGCGTACCCTCGGTGCTATCTTCGCGCCCCAATAGTCGGG		

Tn4401b		TGGATGCCGAGGTCAGGCGAGGTGGCCGACCCATGAACGCCGACCTGATTCGTTTTCAATAGCGCTGGACGTTGTGGTGCC		
Tn4401i				

Tn4401b		AGGGACTTACCAACCCGATGTGTGCCATCCGGGGCAGTTACAGCCGTACAGCCTCTGGAGAGGGAGCGGCTTGCCGCTCG		
Tn4401i				

Tn4401b		GTGATAATCCAGCTGTAGCGCCTGATTACATCCGGCCGTACACCTAGCTCCACCTTCAAACAAGGAATATCGTTG		
Tn4401i		-----AATCCAGCTGTAGCGCCTGATTACATCCGGCCGTACACCTAGCTCCACCTCAAACAAGGAATATCGTTG		
	-35	P1	-10	

Supplementary Table 1. Genome features of CTX-M-15 and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates

Isolate	Local/Brazil Region	Source	Date	ST ¹	CG ²	Tn4401	ISEcp1- <i>bla</i> _{CTX-M-15} element	MIC ³ (µg/ml)I MP	Genome features			
									Genome Size (Mb)	Coding genes	RNA- encoding genes	Accession Number in GenBank
B03	Porto Alegre/S ⁵	Blood	2013	437	258	Tn4401b	+	4	5,387	5,224	85	NTHT00000000
B04	Recife/NE ⁶	Blood	2009	11	258	NTE _{KPC} ⁴	-	>32	5,911	5,800	110	NTGK00000000
B11	Brasília/CO ⁸	Blood	2016	11	258	NTE _{KPC}	+	4	5,290	5,130	64	NTHU00000000
B15	Maringá/S	Urine	2016	11	258	ND	ND	4	ND	ND	ND	ND
B16	Belo Horizonte/SE	Peritoneal secretion	2009	437	258	Tn4401b	+	>32	6,035	5,877	114	NTCW00000000
B17	Goiânia/CO	Blood	2010	443	1345	Tn4401b	-	12	5,368	5,167	76	NTHV00000000
B29	Natal/NE	Urine	2010	340	258	NTE _{KPC}	+	12	5,450	5,301	75	NTHW00000000
B30	João Pessoa/NE	Blood	2016	437	258	NTE _{KPC}	+	>32	5,291	5,141	67	NTHX00000000
B35	Uberaba/SE	Blood	2016	11	258	Tn4401i	-	>32	5,283	5,121	73	NTHY00000000
KPC05	Uberlândia/SE ⁷	Rectal swab	2014	11	258	NTE _{KPC}	+	>32	5,658	5,543	100	NTGJ00000000

¹Sequence Type; ²Clonal Group; ³Minimum Inhibitory Concentration to imipenem; ⁴non-Tn4401 genetic element; ⁵South; ⁶Northeast; ⁷Southeast; ⁸Center-west; ND: Not determined.

Capítulo IV

**Molecular detection of class 1 integron-associated
gene cassettes in KPC-2-producing *Klebsiella
pneumoniae* clones by whole-genome sequencing**

Artigo aceito para publicação no periódico Microbial Drug Resistance em 2019.

Title: Molecular detection of class 1 integron-associated gene cassettes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* clones by whole-genome sequencing

Bruna Fuga Araújo^a, Sabrina Royer^a, Paola Amaral de Campos^a, Melina Lorraine Ferreira^a, Iara Rossi Gonçalves^a, Luiz Gustavo Machado^a, Louise Teixeira Cerdeira^b, Deivid William da Fonseca Batistão^c, Cristiane Silveira de Brito^a, Nilton Lincopan^b, Paulo Pinto Gontijo-Filho^a, Rosineide Marques Ribas^{a,*}

^aLaboratório de Microbiologia Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brazil.

^bFaculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

^cFaculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brazil

Corresponding author.

Present address: Av. Pará, 1720, 38400-902

Uberlândia, MG, Brazil

Contact: +55 34 3225 8574

E-mail address: rosi_ribas@yahoo.com.br (R.M. Ribas).

Abstract

The dissemination of antimicrobial resistance genes and the bacterium that harbour them have increasingly become a public concern, especially in low and middle-income countries. The present study used whole-genome sequencing to analyse 10 KPC-2-producing *K. pneumoniae* isolates obtained from clinical specimens originated from Brazilian hospitals. The study documents a relevant "snapshot" of the presence of class 1 integrons in 90% of the strains presenting different genes cassettes (*dfrA30*, *dfrA15*, *dfrA12*, *dfrA14*, *aadA1*, *aadA2*, and *aac(6')Iq*), associated or not with transposons. Two strains presented non-classical integron (lacking the normal 3'conserved segment). In general, most strains showed a complex resistome, characterizing them as highly-resistant. Integrons, a genetically stable and efficient system, confers to bacteria a highly adaptive and low cost evolution potential to bacteria, an even more serious when associated with high-risk clones, indicating an urgent need for control and prevention strategies in order to avoid the spread of resistance determinants in Brazil. Despite this, although the class 1 integron identified in the KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* clones is important, our findings suggest that other elements probably have a greater impact on the spread of antimicrobial resistance, since many of these important genes were not related to this cassette.

Introduction

Integrans are genetic elements considered one of the major contributors to the acquisition and disseminations of antibiotic resistance genes,^{1,2} with class 1 integrans as the central agents.^{2,3} They have been very successful in spreading to diverse environmental compartments,² justified by their relevant role in bacterial adaptation, resistance genes dissemination and genome evolution.¹

Previously studies have revealed that the dissemination of hospital microorganisms carrying class 1 integrans may confer resistance to several antibiotic categories, including beta-lactams, aminoglycosides, trimethoprim, chloramphenicol, fosfomycin, macrolides, rifampicin, and quinolones,^{4,5} especially in Gram-negative bacterial pathogens.⁵ *Klebsiella pneumoniae* is one of the most concerning opportunistic pathogens involved in antibiotic resistance and its prevalence has increased worldwide, including in low and middle-income countries, like Brazil.⁶⁻⁹ *K. pneumoniae* strains carrying complex class 1 integrans are becoming more common and their role in the dissemination of drug resistance is significant.⁶

In this context, this study aimed to characterize the resistome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* clones carrying class 1 integrans in Brazilian hospitals.

Materials and methods

Data collection

A total of 10 strains, chosen for in order to contemplate different cities and states of Brazil, were selected from a collection of 21 *Klebsiella pneumoniae* strains harboring the *bla*_{KPC} gene (KPC-KP), for whole-genome sequencing (WGS). The strains were recovered from patients admitted to different-sized hospitals in four regions of Brazil (Northeast, Centre west, Southeast and South). The minimum inhibitory concentration (MIC) to imipenem were performed by E-Test® method according to the manufacturer's guidelines (AB Biodisk, Solna, Sweden), and considering resistance ≥ 4 µg/mL according to CLSI.¹⁰

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

The analysis of the genetic similarity among KPC-KP strains was determined by PFGE using the *Xba*I restriction enzyme (Promega, Brazil), described previously,¹¹ with some modifications. The PFGE assay was performed using CHEF DRIII equipment (Bio-Rad, USA), in which the DNA fragments were separated on 1% (w/v) agarose gels in 0.5x TBE

[Tris–borate–ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA)] buffer, using 6 V/cm, pulsed from 5 s to 40 s, for 21 h at 12°C. Gels were stained with ethidium bromide and photographed under ultraviolet light. Computer-assisted analysis was performed using BioNumerics 5.01 software (Applied Maths, Belgium). PFGE patterns were interpreted by the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) using the Dice similarity coefficient.

Whole-genome sequencing

The genomic DNA of selected strains was extracted (PureLink™; Invitrogen) and used to prepare a library that was sequenced using an Illumina NextSeq 500 paired-end reads (150 bp). The sequences reads were *de novo* assembled using Velvet (version 5.0.1) and Geneious (version R9). The assembled contigs were annotated using NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP). Multilocus STs and resistome were screened for using bioinformatics tools available from the Center for Genomic Epidemiology (<http://genomicepidemiology.org/>). The whole-genome sequence data were also evaluated through ISFinder platform (<https://isfinder.biotoul.fr>). The GenBank database at the homepage of the National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) was used to detect previously-published integrase genes located at the conserved regions of the class 1, 2 and 3 integrons (GeneBank accession number EU269034, EU780012, and KF745070). The BLAST program (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) allowed a comparison between these already published integrases and sequences obtained in this work. The integrase and its adjoining sequence were mapped in Geneious software.

Results

The KPC-KP collection strains were isolated from infected or colonized patients in different Brazilian cities (Uberlândia, Uberaba, Belo Horizonte, Brasília, Goiânia, João Pessoa, Recife, Natal, Porto Alegre and Maringá), recovered from several clinical specimens (blood, rectal swab, peritoneal secretion, brain fluid, urine and liquor). The strains were typed by PFGE (A-L pulsotype), revealing five clonally-related groups (A-E) (**Supplementary figure 1**). All clonally-related strains were from the same city, except for clone B, also identified in three other Brazilian cities (Brasília, Goiânia, and Recife).

The antimicrobial susceptibility testing results for the imipenem confirmed the carbapenem resistance profile of the 10 sequenced strains (B03: 4 µg/mL; B04: >32 µg/mL; B11: 4 µg/mL; B15: 4 µg/mL; B16: > 32 µg/mL; B17: 12 µg/mL; B29: 12 µg/mL; B30: >32 µg/mL; B35: > 32 µg/mL; KPC05: > 32 µg/mL).

A retrospective genomic study of sequence strains led to the identification of protein-coding genes, RNA-coding genes (tRNAs, rRNAs, and noncoding RNAs [ncRNAs]), pseudogenes, and genome coverage, available through the access number previously published at NCBI (NTHT000000000, NTGK000000000, NTGJ000000000, NTHU000000000, QWDG000000000, NTCW000000000, NTHV000000000, NTHW000000000, NTHX000000000, and NTHY000000000 of B03, B04, KPC05, B11, B15, B16, B17, B29, B30 and B35 strains, respectively).^{12,13}

The antibiotic resistance gene profile differed among representative isolates, although all of them carried several resistance genes (**Table 1**). A high frequency of plasmid-mediated quinolone resistance and *bla*_{CTX-M} genes in KPC-2-producing *K. pneumoniae* isolates (100% and 80%, respectively) was observed.

Resistance to aminoglycosides is noteworthy, as this was mainly mediated by aminoglycoside modifying enzymes (AMEs), although production of 16S rRNA methyltransferase (16S-RMTase) was also found in one strain (B30), belonging to ST437. The detected 16S-RMTase found (*rmtG* gene) is located in plasmids, but not within an integron.

An MLST analysis identified four different sequence types among the strains (ST11, ST437, ST340 and ST443). WGS data also revealed nine strains harboring a class 1 integron comprising different genes cassettes. Only the B17 strain, belonging to ST443, did not present an integron class 1 integron. In addition, this strain also displayed few aminoglycoside-resistance genes compared to the other strains. The KPC05 strain, despite harboring a class 1 integron, did not present any cassette associated to the resistance genes. Due to the assembly of the WGS data, and analysis of integron-related resistance cassette of the B29 strain was not possible.

Class 1 integrons lacking the normal 3'-CS (*qacEΔ1* and *sul1* genes) and, thus, considered non-classic integrons, were observed in two samples. Both non-classic integrons carried a trimethoprim resistance gene (*dfrA30* and *dfrA14*).

Figure 1 displays the relation of the clones harboring class 1 integrons and their respective resistance genes cassettes during different years. Most sequenced strains (B03, B16, B30 and B35) presented the cassette-carrying *dfrA30* gene. These strains, belonging to two sequence types (ST11 and mainly ST437), exhibited different antimicrobial resistant patterns.

Other cassettes, carrying trimethoprim resistance genes, were found (*dfrA12*, *dfrA14* and *dfrA15*) associated and non-associated to aminoglycoside genes (*aadA1*, *aadA2* and *aac(6')Id*). The presence of different cassettes independent of ST and clonal profiles obtained by PFGE for different years was observed. Exceptionally, the ST11 B04 strain (Recife-RN, Brazil), recovered from blood, exhibited the most resistance genes (*dfrA15*, *aadA1* and *aac(6')Id*) associated to integrons, located inside a transposon (Tn21). The Tn21, in addition to carrying the integron and its resistance gene-associated genetic cassette, also carries the genes involved in its own transposition (*tnp*) and a mercury resistance (*mer*) operon.

Discussion

Although integrons are not mobile genetic elements, their association with transposons, as observed herein, increases the dissemination threat of important resistance genes present in several bacterial genera,^{1,14} such as those encoding aminoglycoside-resistance. The presence of these integrons in high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* from several Brazilian regions indicate the importance of this element.

As the numbers infections by KPC-producing *K. pneumoniae* isolates have increased,¹⁵ so has the possibility that *bla_{KPC}* and other genes will “escape” and recombine with a broader range of mobile genetic elements, displaying the potential to spread beyond KPC to other Gram-negative microorganisms. This is evidenced in the literature by the establishment of international high-risk clones (i.e., ST11, ST340 and ST437), favoured by increased globalization, offering opportunities for the dissemination of important resistance genes.^{16,17}

Studies have demonstrated that the presence of these integrons in high-risk clones, although associated with popular gene cassettes (resistance genes to trimethoprim and aminoglycosides),^{6,18} may also carry other important resistance genes, such as *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* and *bla_{OXA}*.^{4,15} This, alongside antimicrobial resistance factors, has contributed to the successful adaptation of these bacteria to the clinical environment.^{1,19} In the present study, although the strains presented an MDR profile, these atypical cassettes were not evidenced.

Although this study not contemplate the minimum inhibitory concentration of all classes of antimicrobials, it allowed to detect a rich panorama of resistance genes present in these strains collected in Brazil. This complex resistome was observed in strains presenting class 1 integrons which reinforces the importance of other genetic elements, including the bacterial chromosome background, in epidemiologically important strains.¹⁹ The absence of class 1 integrons in the B17 strain, alongside the presence of few associated resistance genes, may indicate that strains presenting class 1 integrons can behave as resistance genes reservoirs, related to the widespread multidrug-resistance in clinically relevant Gram-negative pathogens.⁶

Integrons are potent agents related to bacterial evolution, providing access to various cassette-encoded roles.⁵ Assessing the threat posed by integrons in diverse environments requires an understanding of their biology, as well as their dissemination.¹ This is very relevant, since integrons are currently not only considered of clinical concern, but, also important regarding bacterial adaptation and evolution.¹

The results described herein provide a relevant "snapshot" of the resistome and class 1 integron-associated gene cassettes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in important Brazilian regions. The evident association of specific genotypes and class 1 integrons, although requiring further clarification, may explain the endemic capacity of these strains by the dissemination of pre-existing high-risk clones.

Acknowledgments

The authors would like to appreciate the Silvia Dias Oliveira (Immunology and Microbiology Laboratory, Faculty of Biosciences Pontifical, Catholic University of Rio Grande do Sul), Márcia Maria Camargo Morais (Microbial Resistance Laboratory, University of Pernambuco) and Magna Cristina de Paiva (Federal University of São João del Rei, Dona Lindu Campus, Divinópolis), who kindly provided the control strains to this study. We thank Daise Aparecida Rossi (Applied Animal Biotechnology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine) for providing technical support.

Funding: This work was supported by the FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais) and Brazilian Funding Agency CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Competing interests: No competing financial interests exist.

Ethical approval: Not required.

Reference

1. **Gillings, M.R.** 2014. Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 78(2):257–277.
2. **Zhang, A.N., L. Li, L. Ma, M.R. Gillings, J.M. Tiedje, T. Zhang.** 2018. Conserved phylogenetic distribution and limited antibiotic resistance of class 1 integrons revealed by assessing the bacterial genome and plasmid collection. *Microbiome*. 6:130.
3. **Ghaly, T.M., L. Chow, A.J. Asher, L.S. Waldron, M.R. Gillings.** 2017. Evolution of class 1 integrons: Mobilization and dispersal via foodborne bacteria. *PLoS ONE*. 12(6): e0179169.
4. **Stalder, T., O. Barraud, M. Casellas, C. Dagot, M. Ploy.** 2012. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*. 3:1-14.
5. **Escudero, J.A., C.Loot, A. Nivina, D. Mazel.** 2014. The integron: adaptation on demand. *Microbiol Spectrum*. 3(2):MDNA3-0019.
6. **Li, B., Y. Hu, Q. Wang, Y. Yi, P.C.Y Woo, H. Jing, B. Zhu, C.H. Liu.** 2013. Structural Diversity of Class 1 Integrons and Their Associated Gene Cassettes in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from a Hospital in China. *PLOS ONE*. 8(9):e75805.
7. **Sampaio, J.L., Gales, A.C.** 2016. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol*. 47 Suppl 1:31-37.
8. **Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., Carattoli, A.** 2017. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 1;41(3):252-275.
9. **Temkin, E., Fallach, N., Almagor, J., Gladstone, B.P., Tacconelli, E., Carmeli, Y., DRIVE-AB Consortium.** 2018. Estimating the number of infections caused by antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 2014: a modelling study. *Lancet Glob Health*. 6(9):e969-e979.
10. **CLSI.** 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Document M100-S28. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

11. **Galetti, R.** 2010. Estudo de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamases e de genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos. Dissertation, Universidade de São Paulo.
12. **Araujo, B.F., M.L. Ferreira, P.A. Campos, S. Royer, I.R. Gonçalves, D.W.F. Batistão, M.R. Fernandes, L.T. Cerdeira, C.S. Brito, N. Lincopan, P.P. Gontijo-Filho, R.M. Ribas.** 2018a. Hypervirulence and biofilm production in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil. *Journal of Medical Microbiology*. 67(4):523-528.
13. **Araujo, B.F., S. Royer, P.A. Campos, M.L. Ferreira, I.R. Gonçalves, L.G. Machado, N. Lincopan, M.R. Fernandes, L.T. Cerdeira, D.W.F. Batistão, P.P. Gontijo-Filho, R.M. Ribas.** 2018b. Insights into a novel Tn4401 deletion (Tn4401i) in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical strain belonging to the high-risk Clonal Group 258 producing KPC-2. *Int J Antimicrob Agents*. 52(4):525-527.
14. **Domingues, S., G.J. Silva, K.M. Nielsen.** 2015. Global dissemination patterns of common gene cassette arrays in class 1 integrons. *Microbiology*. 161:1313–1337.
15. **Pitout, J.D.D., P. Nordmann, L. Poirel.** 2015. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother*. 59:5873–5884.
16. **van der Bij, A.K., J.D.D. Pitout.** 2012. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 67:2090–2100.
17. **Pereira, P.S., C.F. de Araujo, L.M. Seki, V. Zahner, A.P. Carvalho-Assef, M.D. Asensi.** 2013. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother*. 68:312-6.
18. **Kor, S., Q. Choo, C. Chew.** 2013. New integron gene arrays from multiresistant clinical isolates of members of the Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* from hospitals in Malaysia. *Journal of Medical Microbiology*. 62: 412–420.
19. **Munita, J.M., C.A. Arias.** 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *MicrobiolSpectr*. 4(2):1-37.

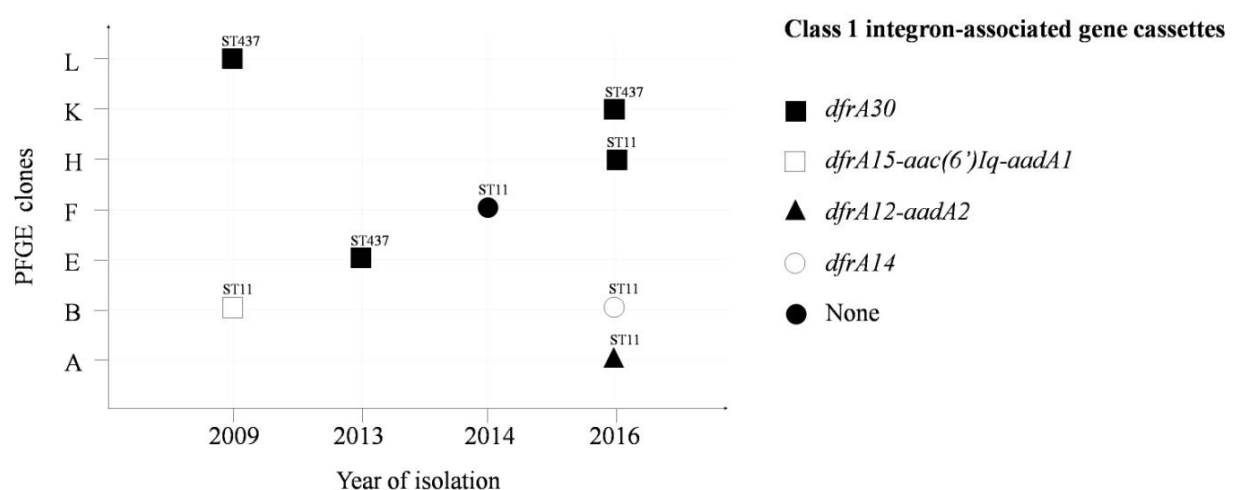
Figure Legends

Figure 1. Representation of the gene cassettes embedded in class 1 integrons in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* clones belonging to different STs, from different years. The black square, white square, black triangle, and white circle represents cassettes carrying *dfrA30*, *dfrA15-aac(6')Iq-aadA1*, *dfrA12-aadA2*, and *dfrA14* genes, respectively. The black circle represents the class 1 integron structure without the gene cassette.

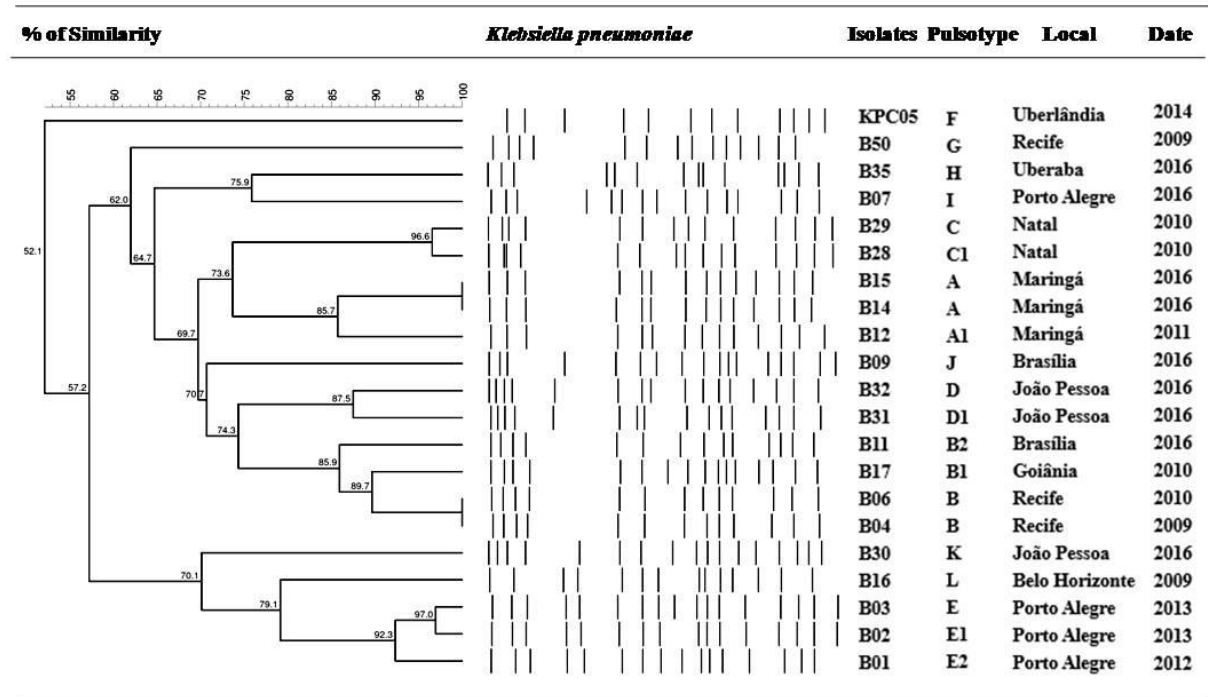
Supplementary Figure 1. Dendrogram based on similarity by PFGE patterns from 21 representative *Klebsiella pneumoniae* isolates used in this study using the Dice coefficient under 1% tolerance and 1% optimization. A similarity coefficient of 80% was chosen for cluster definition.

Supplementary Figure 2. Decision Letter.

Figure 1.



Supplementary Figure 1.



Supplementary Figure 2.

Microbial Drug Resistance

Decision Letter (MDR-2018-0437.R2)

From: tomasz@rockefeller.edu
To: rosi_ribas@yahoo.com.br
CC:
Subject: Microbial Drug Resistance - Decision on Manuscript ID MDR-2018-0437.R2
Body: 24-Mar-2019

Dear Dr. Ribas:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Molecular detection of class 1 integron-associated gene cassettes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* clones by whole-genome sequencing" in its current form for publication in Microbial Drug Resistance.

Please be sure to cite this article to ensure maximum exposure of your work.

All authors will get a follow-up email with instructions on how to complete our online Copyright Agreement form.

FAILURE BY ALL AUTHORS TO SUBMIT THIS FORM MAY RESULT IN A DELAY OF PUBLICATION.

The corresponding author is responsible for communicating with coauthors to make sure they have completed the online copyright form. Authors not permitted to release copyright must still return the form acknowledging the statement of the reason for not releasing the copyright. The corresponding author will receive notification when all copyright forms have been submitted.

Consider Liebert Open Option to have your paper made free online immediately upon publication for a one-time fee. Benefits of Liebert Open Option include: accelerated e-pub ahead of print publication; email message highlighting the article; increased readers, citations and downloads; an identifying icon in the table of contents showing that the paper is permanently available for free to all readers; and immediate deposition into PubMed Central®. Please contact OpenAccess@liebertpub.com or call (914) 740-2194 for more information.

If your institution is not currently subscribing to this journal, please ensure that your colleagues have access to your work by recommending this title (http://www.liebertpub.com/mcontent/files/lib_rec_form.pdf) to your Librarian.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Microbial Drug Resistance, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Prof. Alexander Tomasz
Editor-in-Chief, Microbial Drug Resistance
tomasz@rockefeller.edu

Date Sent: 24-Mar-2019

Table 1. Relation of resistance genes with sequence type in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates analyzed by whole-genome sequencing

Resistance genes	Sequence Type									
	ST11					ST437			ST340	ST443
	B04 ¹	KPC05 ¹	B11 ¹	B15 ¹	B35 ¹	B03 ¹	B16 ¹	B30 ¹	B29 ¹	B17 ¹
Aminoglycoside										
<i>aph(3')-Ia</i>										
<i>aac(3)Iid</i>										
<i>aac(3)Iia</i>										
<i>aph(3')-Vla</i>										
<i>aac(6')-Iq</i>										
<i>aadA1</i>										
<i>aadA2</i>										
<i>strA</i>										
<i>strB</i>										
<i>rmtG</i>										
β-lactam										
<i>bla_{KPC-2}</i>										
<i>bla_{CTX-M-2}</i>										
<i>bla_{CTX-M-15}</i>										
<i>bla_{SHV-1}</i>										
<i>bla_{SHV-11}</i>										
<i>bla_{TEM-1A}</i>										
<i>bla_{TEM-1B}</i>										
<i>bla_{OXA-1}</i>										
<i>bla_{OXA-9}</i>										
Fluoroquinolone										
<i>aac(6')Ib-cr</i>										
<i>oqxA</i>										
<i>oqxB</i>										
<i>qnrB1</i>										
<i>qnrB19</i>										
<i>qnrS1</i>										
Fosfomycin										
<i>fosA</i>										
Chloramphenicol										
<i>catA1</i>										
<i>catB3</i>										
<i>cmlA1</i>										
Sulphonamide										
<i>sul1</i>										
<i>sul2</i>										
<i>sul3</i>										
MLS²										
<i>mph(A)</i>										
Trimethoprim										
<i>dfrA12</i>										

<i>dfrA14</i>					
<i>drfA15</i>					
<i>dfrA30</i>					
Tetracycline					
<i>tet(A)</i>					
<i>tet(D)</i>					
Rifampicin					
<i>ARR-3</i>					

¹Strains used in the study; ²Macrolides, lincosamides, streptogramines. The presence of the resistance genes of the strains are highlighted in gray.

Capítulo V

**An atypical small IncX3 plasmid carrying *bla*_{KPC-2}
gene in high-risk lineage of pandrug-
resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11/CG258**

Artigo submetido para publicação no periódico International Journal of Antimicrobial Agents em 2019.

Title: An atypical small IncX3 plasmid carrying the *bla*_{KPC-2} gene in high-risk pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11/CG258

Running title: Atypical small IncX3 plasmid carrying the *bla*_{KPC-2} gene

Bruna Fuga^{a,*}, Melina Lorraine Ferreira^{a,*}, Louise Teixeira Cerdeira^b, Paola Amaral de Campos^a, Vinícius Lopes Dias^a, Iara Rossi^a, Luiz Gustavo Machado^a, Nilton Lincopan^b, Paulo Pinto Gontijo-Filho^a, Rosineide Marques Ribas^a

^aLaboratório de Microbiologia Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brazil.

^bFaculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

*These authors contributed equally to this work.

Corresponding author

Rosineide Marques Ribas

Present address: Av. Pará, 1720, 38400-902

Uberlândia, MG, Brazil

Contact: +55 34 3225 8574

E-mail address: rosi_ribas@yahoo.com.br.

Abstract

This study used whole-genome sequencing (WGS) and PFGE to analysis KPC-2-producing *K. pneumoniae* isolates from clinical specimens collected in Brazilian hospitals. The study identifies the emergence of an atypical small IncX3 plasmid (pKPB11), 12,757-bp in length, in a high-risk *K. pneumoniae* ST11/CG258 lineage, a successful clonal group in Brazil, carrying the *bla*_{KPC-2} gene on a non-Tn4401 genetic element (NTE_{KPC-Ic}). The pKPB11 plasmid was compared to the NCBI database, and it was observed that this plasmid reduced its size, losing part of its conjugation apparatus. This plasmid was compared to that of another strain sequenced in this study (KPC89), that had the hybrid IncX3-IncU plasmid (pKP89), of approximately 45 kb in length, also carrying the *bla*_{KPC-2} gene on NTE_{KPC-Ic}. To the best of our knowledge, pKPB11 is the first example of an atypical small IncX3 plasmid found in a high-risk *K. pneumoniae* ST11/CG258 that encodes a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, CG258, KPC-2, IncX3, small plasmid.

1. Introduction

IncX3-type plasmids have achieved clinical significance worldwide, especially because of their contribution to the dissemination of *bla*_{KPC} genes, which confer carbapenem resistance [1-4]. This plasmid-mediated *bla*_{KPC} gene contributes to the global establishment of high-risk clones, especially among *Klebsiella pneumoniae* strains from different host and environment [5-6].

More recently, the IncX3 plasmid has been found associated to the IncU incompatibility group, with a total size of approximately 45 kb [7]. Interestingly, the literature has described the importance of small plasmid (~10 kb) as an adaptation phenomenon concerning both antibiotic resistance levels and fitness cost, which will determine the success of the persistence of this small plasmid-bearing clones during and after antibiotic treatment [8].

Given the profound implications of increasing resistance to carbapenems, it is vital to understand the mechanisms that contribute to the spread of resistance genes [9]. In this study, we report the detailed genomic characterization of an atypical small IncX3 plasmid carrying *bla*_{KPC-2} recovered from pandrug-resistant *K. pneumoniae* belonging to the ST11/CG258 lineage.

2. Materials and methods

Based on the whole-genome sequencing (WGS) of several strains of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, two pandrug-resistant strains (B11 and KPC89) were selected for analysis of KPC-containing plasmids. The total genomic DNA of the B11 and KPC89 strains was used to construct a library, which was sequenced using an Illumina NextSeq 500 paired-end reads (150-bp). The *de novo* assemblies were performed using the Unicycler (v0.4.0) software and the contigs were curated using the Geneious (R9) and Bandage programs (Bioinformatics Application for Navigating De novo Assembly Graphs Easily) [10]. Plasmid classification, Multilocus STs and resistomes were screened using bioinformatics tools available from the Center for Genomic Epidemiology (<http://genomicepidemiology.org/>). BLASTn allowed for comparisons with previously published plasmids, while Easyfig (<http://mjsull.github.io/Easyfig/>) allowed for the creation of comparative images, and Geneious, for the creation of circular plasmid figure.

Genetic relationship among isolates was determined by analysis of *Xba*I digested genomic DNA on Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), performed in CHEF DRII System (Bio-

Rad, USA), according to method described previously [11]. The gel was stained with ethidium bromide and analyzed with the BioNumerics fingerprinting software (Applied Maths, Belgium). PFGE patterns were interpreted by the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) using the Dice similarity coefficient. The homology cutoff value of 80% was used to group the related strains.

3. Results

High-throughput sequencing revealed that the pKP89 plasmid was approximately 45 kb in size (GenBank accession no. MK264770), and that the replication module presents on this plasmid belonged to the hybrid IncX3-IncU incompatibility group. This plasmid exhibited the *bla*_{KPC-2} gene not associated with an entire Tn4401 transposon, as well as an array of genes involved in replication, mobilization, conjugation and other accessory genes. The architectural conservation observed in pKP89 was similar to other previously sequenced IncX3-IncU plasmids (Figure 1).

Briefly, alignments between pKP89 and the other IncX3-IncU plasmids available at GenBank indicated a 99% nucleotide identity with pKP1194a (GenBank accession no. KX756453.1), which was found in the ST340 *Klebsiella pneumoniae* strain isolated in 2011 from a catheter tip culture, pKP13d (GenBank accession no. CP003997.1), which was detected in a ST442 *Klebsiella pneumoniae* strain isolated in 2009 from a human blood sample, and pKP64477d (GenBank accession no. MF150120.1), found in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated in 2014 from a human urine sample, all recovered in Brazil. In addition, pKP89 displayed high similarity (99% nucleotide identity) topMTY16641_IncX3-IncU (GenBank accession no. BFCA01000004), found in the ST258 *Klebsiella pneumoniae* strain recovered in 2016 in Tokyo, Japan. The KPC89 strain also presented other incompatibility groups (IncFII(K), IncFIB(Mar), IncL/M(pMU407), IncFIB(K), IncHI1B, IncR) in its genome.

Interestingly, the KPC89 strain (recovered from a colonized patient in 2015 in Uberlândia, Brazil) harboring a hybrid IncX3-IncU plasmid presented the same clonal profile as another KPC-producing *K. pneumoniae*, named the B11 strain (recovered from blood infection sample in 2016 in Brasília, Brazil). However, the strains presented different sequence types (STs), such as ST340 (KPC89) and ST11 (B11), both pandrug-resistant.

Compared with other previously sequenced plasmids, the B11 strain described herein presented an atypical small plasmid of about 12 kb (named pKPB11), without total homology with any other plasmid published in the NCBI database so far, such as pKP13d (GenBank accession no. CP003997.1), pKP1194a (GenBank accession no. KX756453.1), pKP89 (GenBank accession no. MK264770), pKP64477d (GenBank accession no. MF150120.1), punnamed5 (GenBank accession no. CP027700), pEc2A (GenBank accession no. KR822247.1), and pD51700990 (GenBank accession no. KX1692264.1) and pMTY16641_IncX3_IncU (GenBank accession no. BFCA01000004).

This pKPB11 plasmid (GenBank accession no. MK264769) belonging to the IncX3 incompatibility group displayed a basic structure that included only sequences encoding replication, resistance (*bla*_{KPC-2} gene on non-Tn4401 genetic element-NTE_{KPC}-Ic) and accessory genes. In addition, the strain carrying this plasmid also possesses other incompatibility groups (IncFIA(HI1), IncFIB(K), and IncR) in its genome.

4. Discussion

Recently, the literature has indicated that IncX3-type plasmids have achieved clinical significance worldwide mediating the spread of genes encoding resistance for clinically relevant, first-line (extended-spectrum beta-lactam and fluoroquinolones) and last-resource (carbapenems) antibiotics [4]. Some studies have demonstrated, through more detailed bioinformatics comparative analyses, that IncX3 plasmids may be associated to the IncU incompatibility group [7], which is found mainly in species belonging to the *Aeromonas* genus [12], resulting in the appearance of strains containing a hybrid plasmid (IncX3-IncU) of approximately 45 kb in size (GenBank accession no. BFCA01000004). In this study, this hybrid plasmid was observed in a clinical KPC-2-producing *K. pneumoniae* strain involved in one of the largest colistin resistance outbreaks described in Brazil [13].

Surprisingly, our study revealed the presence of an atypical small IncX3 plasmid carrying the *bla*_{KPC-2} gene in high-risk lineages of *K. pneumoniae* CG258 belonging to the same clone as the KPC89 strain by PFGE. Clearly, the IncX3 plasmid was reduced in size, losing several genes, mostly the conjugation apparatus. Even though this plasmid does not present conjugative abilities, this report highlights the importance of small plasmids carrying antibiotic resistance genes and their mobilization ability by their cointegration with conjugative plasmids [14-16], which typically coexist in the same bacteria [16]. The B11

strain presented herein also harbored common variants of IncF conjugative plasmids (IncFIA and IncFIB).

Previous studies have demonstrated that IncX3 plasmids are highly stable, due to their high conjugation frequency and absence of a fitness burden [4]. Thus, the drastic loss of genes observed in the pKPB11 plasmid may represent an important plasmidial dissemination strategy with lower fitness costs in epidemiologically important Gram-negative microorganisms. The findings reported herein contribute to a better understanding of the plasmids involved in the dissemination of the *bla*_{KPC} genes in *K. pneumoniae*, although the epidemic potential of the atypical small IncX3 plasmid remains to be elucidated.

In conclusion, to the best of our knowledge, pKPB11 is the first example of an atypical small IncX3 plasmid found in high-risk of *K. pneumoniae* ST11/CG258 lineage that encodes a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

Acknowledgments

The authors would like to appreciate the LÍlian Alves Rocha (Brasília, Brazil), who kindly provided the strain to this study, and Daise Aparecida Rossi (Applied Animal Biotechnology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine) for providing technical support.

Funding

This work was supported by the Brazilian Funding Agency FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (FAPESP 2015/21325-0).

Competing interests

No competing financial interests exist.

Ethical approval

Not required.

Reference

1. Ho PL, Cheung YY, Lo WU, Li Z *et al.* Molecular characterization of an atypical IncX3 plasmid pKPC-NY79 carrying *bla*_{KPC-2} in a *Klebsiella pneumoniae*. *Curr Microbiol* 2013;67:493-8.
2. Kim JO, Song SA, Yoon EJ *et al.* Outbreak of KPC-2-producing Enterobacteriaceae caused by clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST307 carrying an IncX3-type plasmid harboring a truncated Tn4401a. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;87:343-8.
3. Cerdeira LT, Cunha MPV, Francisco GR *et al.* IncX3 plasmid harbouring a non-Tn4401 genetic element (NTE-KPC) in a hospital-associated clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST340/CG258. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;89(2):164-167.
4. Liakopoulos A, van der Goot J, Bossers A *et al.* Genomic and functional characterisation of IncX3 plasmids encoding *bla*_{SHV-12} in *Escherichia coli* from human and animal origin. *Scientific Reports* 2018;8:7674.
5. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* 2015;28(3):565-91.
6. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2017;41(3):252-275.
7. Ainoda Y, Aoki K, Ishii Y *et al.* *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 isolated from a Japanese patient without a history of foreign travel - a new public health concern in Japan: a case report. *BMC Infect Dis* 2019;19(1):20.
8. Millan AS, Santos-Lopez A, Ortega-Huedo R *et al.* Small-Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance Is Enhanced by Increases in Plasmid Copy Number and Bacterial Fitness. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(6):3335–3341.
9. Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *The Journal of Infectious Diseases* 2017;215(S1):S28–36.
10. Wick RR, Schultz MB, Zobel J *et al.* Bandage: interactive visualisation of de novo genome assemblies. *Bioinformatics* 2015;31(20):3350-3352.

11. Galetti R. Estudo de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamases e de genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos. Dissertation, Universidade de São Paulo. 2010.
12. Dobiasova H, Videnska P, Dolejskaa M. Complete Sequences of IncU Plasmids Harboring Quinolone Resistance Genes *qnrS2* and *aac(6')-Ib-cr* in *Aeromonas* spp. From Ornamental Fish. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:653–657.
13. Rossi IG, Ferreira ML, Araujo BF *et al.* Outbreaks of colistin-resistant and colistin-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Brazilian intensive care unit. *J. Hosp. Infect* 2016;94:322–329.
14. Derbyshire KM, Willetts NS. Mobilization of the non-conjugative plasmid RSF 1010: A genetic analysis of its origin of transfer. *Mol Gen Genet* 1987;206:154-160.
15. Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV *et al.* Mobility of Plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010;74(3):434–452.
16. Hartl DL. *Essential Genetics: A Genomics Perspective*. 5th ed. Jones and Bartlett Publishers, LLC. 2011.

Figure Legends

Fig. 1. A. Comparison of a small IncX3 plasmid carrying the *bla*_{KPC-2} gene into a non-Tn4401 genetic element (NTE_{KPC-Ic}) with IncX3 pEc2A plasmid (74,852-bp size) from *Escherichia coli*, IncU pD51700990 (32,424-bp size) from *Pseudomonas aeruginosa*, IncX3/IncU pKP1194a (45,674-bp size) from *Klebsiella pneumoniae*, IncX3-IncU pKP89 (45,575-bp size) from *Klebsiella pneumoniae* and IncX3-IncU pMTY16641 (46,380-bp size) from *Klebsiella pneumoniae*. High sequence identity levels between plasmid sequences are indicated as gray blocks. **B.** Circular small IncX3 plasmid carrying the *bla*_{KPC-2}, displaying the absence of conjugative genes.

Capítulo VI

Considerações finais

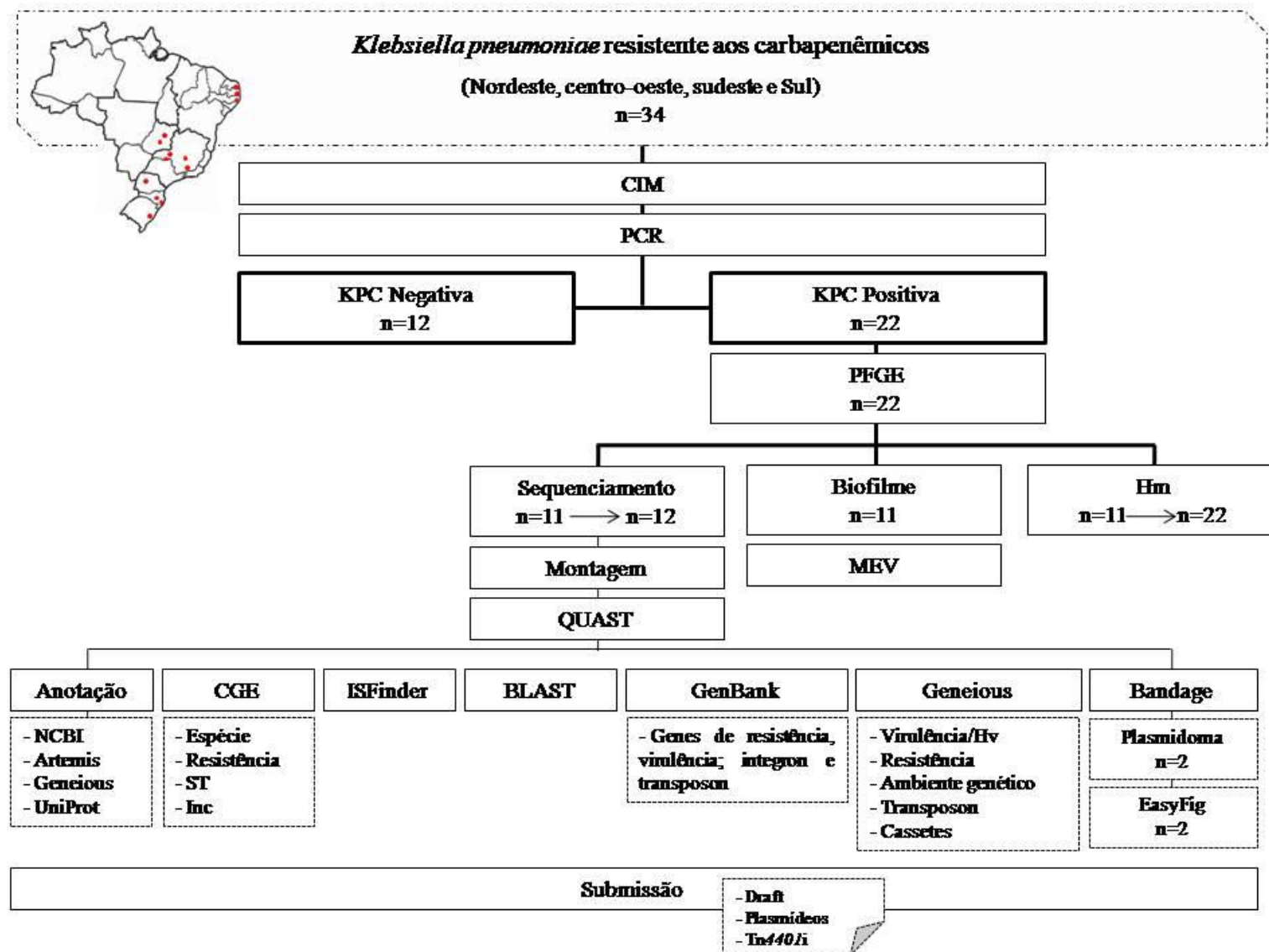
Os resultados desse estudo permitem melhor compreender a epidemiologia molecular de linhagens clínicas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 no Brasil. Utilizando-se de uma abordagem genômica, aspectos relacionados ao resistoma, viruloma, mobiloma e plasmidoma dessas cepas puderam ser melhor esclarecidos. Embora o estudo tenha utilizado um número pequeno de cepas, foram representativas dos hospitais brasileiros, e assim foi possível elucidar particularidades da multirresistência e dos elementos genéticos associados em cepas de KPC. Adicionalmente, os resultados obtidos permitiram as seguintes considerações:

- Interessantemente, novas informações sobre elementos genéticos móveis associados ao gene *bla*_{KPC-2} em cepas de *K. pneumoniae* foram publicadas. A partir desse estudo, foi possível detectar uma nova variante do transposon Tn4401, denominada Tn4401i, bem como em um plasmídeo IncX3 atípico, muito menor do que aqueles já descritos na literatura. Outros elementos genéticos móveis, como sequências de inserção e cassetes gênicos em integrons de classe 1, também foram documentados nesse estudo em associação com diversos genes de resistência.
- Foi possível demonstrar a importante associação entre a presença de KPC-2 e a alta prevalência do gene *bla*_{CTX-M} em cepas clínicas de *K. pneumoniae*, fato cada vez mais significativo para a realidade brasileira, questão que não deve ser ignorada devido à sua endemicidade.
- De modo geral, as cepas estudadas apresentaram um resistoma complexo e frequência elevada de genes de virulência, o que fez com que fosse possível documentar a presença de cepas altamente virulentas e hipermucoviscosas, comprometendo ainda mais o tratamento dos pacientes.
- Coletivamente, as investigações desse estudo confirmam achados prévios em relação à capacidade de formação de biofilme em cepas clínicas de *K. pneumoniae*, independentemente do ano de isolamento, bem como do sítio de infecção. E sugere uma estreita relação entre ST437 e fraca produção de biofilme.
- *K. pneumoniae* produtoras de *bla*_{KPC-2} pertencente ao CG258 foi confirmada como clone de alto risco dominante nas diferentes regiões do Brasil (nordeste, centro oeste, sudeste e sul), especialmente relacionada ao ST11, enquanto que padrões distintos de clonalidade foram observados por PFGE.

Os aspectos apresentados tornam *K. pneumoniae* um patógeno bem-sucedido em causar infecções, levando a sua rápida expansão e persistência em ambientes hospitalares. Neste contexto, todo conhecimento apresentado aqui torna-se fundamental para que, em um futuro próximo, novas estratégias possam ser formuladas e implementadas a fim de controlar a expansão de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 no Brasil, bem como a resistência, de modo mais eficaz.

Capítulo VII

Apêndice



Apêndice 1. Organograma representativo dos testes realizados nas amostras de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos.