

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

**Estudo molecular de clones de alto risco de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase do tipo KPC resistentes a colistina**

Melina Lorraine Ferreira

Uberlândia  
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

**Estudo molecular de clones de alto risco de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase do tipo KPC resistentes a colistina**

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

Orientadora:

Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas.

Melina Lorraine Ferreira

Uberlândia  
2019

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

F383 2019	Ferreira, Melina Lorraine, 1990- Estudo molecular de clones de alto risco de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de carbapenemase do tipo KPC resistentes a colistina [recurso eletrônico] / Melina Lorraine Ferreira. - 2019.
	Orientadora: Rosineide Marques Ribas. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2237">http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2237</a> Inclui bibliografia.
	1. Imunologia. I. Marques Ribas, Rosineide, 1974-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.
	CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



**Melina Lorraine Ferreira**

“Estudo molecular de clones de alto risco de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase do tipo KPC resistentes a colistina”

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, 16 de julho de 2019.

Prof. Dr. Caio Augusto Martins Aires  
UFERSA

Prof. Dr. Guilherme Ramos O. e Freitas  
UFU/Patos de Minas

  
Dra. Cristiane Silveira de Brito  
ICBIM/UFU

  
Profa. Dra. Helisângela de Almeida Silva  
ICBIM/UFU

  
Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas - orientadora  
ICBIM/UFU

*Dedico este trabalho com muito amor e gratidão aos que sempre estiveram comigo, meus pais, irmãos e meu esposo Francisco, incentivadores incansáveis dos meus estudos.*

“A lei da mente é implacável. O que você pensa, você cria; O que você sente, você atrai; O que você acredita, torna-se realidade.”

(Buda)

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, fonte de toda sabedoria e amor, por ter guiado meus passos, iluminado meus caminhos e permitido que eu chegasse ao fim de mais uma etapa em minha vida.

Aos meus pais, **Mauro e Nininha**, por todo amor, empenho e dedicação, por me entenderem e estarem comigo em todos os momentos, pelas palavras de incentivo e apoio, pela torcida, orações e por serem sempre o meu porto seguro.

Aos meus irmãos, **Marcell e Murillo**, meus fieis protetores, pelo carinho, cuidado e companheirismo. Aos meus sobrinhos **Otávio e Raul**, pelos momentos maravilhosos de alegria, sorrisos e brincadeiras.

Ao meu esposo **Francisco**, o seu amor, amizade, companheirismo e incentivo foram essenciais nessa etapa. Obrigada por fazer com que cada obstáculo tivesse um peso mais leve e por fazer meus dias mais felizes.

A todos os meus familiares, em especial meus padrinhos **Pedro e Elci**, primos **Patrícia, Pedro Paulo e Manoel Victor** pelo apoio incondicional.

A minha orientadora, **Prof<sup>ª</sup>. Dra. Rosineide Marques Ribas**, pela oportunidade de aprendizado, disponibilidade, dedicação e exemplo.

Ao **Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho**, pelas valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho, pela oportunidade de aprendizado e pelo exemplo profissional.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia Molecular (UFU) e também da vida, **Bruna, Daiane, Deivid, Iara, Luiz Gustavo, Paola, Sabrina e Vinicius**, por toda a ajuda, companhia, momentos de diversão, e muito aprendizado.

A todos os queridos amigos, em especial **Eliza, Nathalia e Thalita**, sempre presentes e que comemoram comigo mais esta vitória.

As técnicas do Laboratório de Microbiologia Molecular (UFU), **Cristiane e Lícia**, pelo suporte, auxílio e amizade.

Aos professores **Prof. Dr. Caio Augusto Martins Aires** (UFERSA), **Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas** (UFU-Patos de Minas), **Prof<sup>a</sup>. Dra. Helisângela de Almeida e Silva** (UFU-Uberlândia) e **Prof<sup>a</sup>. Dra. Leticia de Melo Mota** (UFU-Uberlândia), por aceitarem participar da minha banca de Doutorado e pelas contribuições que darão ao trabalho.

As professoras que participaram da minha banca de qualificação, **Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana Pena Porto** (UFU), **Prof<sup>a</sup>. Dra. Raquel Cristina Cavalcanti Dantas** (UFU) e **Prof<sup>a</sup>. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa** (UFU), pelas grandes contribuições no artigo publicado e no projeto de pós-doutorado.

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

Aos **profissionais de saúde do Hospital de Clínicas**; à equipe do Laboratório de Microbiologia do HC-UFU; à equipe do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar; aos funcionários do Setor de Registros Médicos por toda ajuda prestada.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, particularmente à **Dra. Daise Aparecida Rossi** e os alunos **Guilherme Paz Monteiro, Roberta Torres de Melo e Eliane Pereira Mendonça**, sempre dispostos a dividir conhecimentos, bem como emprestar reagentes e equipamentos, garantindo o bom desenvolvimento do nosso trabalho.

Ao professor **Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman** (USP) e à doutoranda **Louise Teixeira Cerdeira** (USP), pelo suporte técnico e científico na análise do genoma bacteriano e pela gentileza em ceder uma das amostras controle utilizada neste trabalho.

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.

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

**Muito Obrigada!**



## RESUMO

O surgimento de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e polimixinas é uma ameaça ao tratamento antimicrobiano. Neste estudo, nós investigamos as bases moleculares da resistência a colistina em 23 cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase do tipo KPC (KP-KPC), de colonização e infecção, provenientes de um surto ocorrido em um hospital público de ensino no Brasil. Utilizou-se a análise do sequenciamento completo do genoma para determinar os mecanismos de resistência a colistina, em uma cepa representante de cada clone, determinado a partir da técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE). Adicionalmente, foram realizadas análises genotípicas a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os seguintes genes de resistência (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *mcr-1*) e virulência (*fimH*, *fimA*, *wabG*, *iucC*, *Khe*, *ecpA*, *entB*, *iutA*, *mrkD*, *rmpA*, *kfU*, *ybtS*, *allS*) e experimentos fenotípicos para avaliar a capacidade de formação de biofilme (ensaio de adesão, quantificação de células viáveis e formação de biofilme) e a característica de hiper mucoviscosidade (*string test*). O estudo evidenciou dados preocupantes quanto ao consumo de antibióticos, principalmente de cefalosporinas de amplo espectro, carbapenêmicos e polimixinas o que pode estar relacionado com a emergência de cepas de KP-KPC resistentes a colistina. No total, foram identificados cinco padrões de perfis clonais com a maioria das cepas pertencentes ao clone A (82,6%). O estudo de clonalidade evidenciou também que a maioria das infecções recorrentes foram causadas pela mesma cepa que estava previamente colonizando ou infectando, e demonstrou-se a capacidade de múltiplos clones coexistir no mesmo paciente. Entre as amostras sequenciadas (N = 4, clones A, B, C e D), foram observados diferentes *sequence types* (STs: ST11, ST37, ST340 e ST1484). Foi possível observar um resistoma complexo com frequências elevadas de genes de resistência e virulência, e juntamente com testes fenotípicos foi documentada a presença de cepas altamente virulentas, sendo uma também hiper mucoviscosa. De modo geral, elas foram produtoras de biofilme, independentemente da resistência a colistina, perfil clonal e o sítio de isolamento, aumentando a sua persistência e dificultando a erradicação. Pela primeira vez no Brasil, foi identificado um fragmento de 3.055 pares de base inserido no gene *mgrB*, composto pela sequência de inserção ISE*cpl* e o gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> na cepa 40KPC (representativa do clone dominante A) o que resultou em resistência adquirida concomitantemente as cefalosporinas de amplo espectro e colistina. O sequenciamento do genoma permitiu a identificação de uma espécie caracterizada como *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, altamente virulenta, hiper mucoviscosa

e resistente a colistina, que pode ser outro importante reservatório de genes de resistência. Os aspectos apresentados aqui, reforçam *K. pneumoniae* como um patógeno bem-sucedido em causar infecções, resultando na sua rápida expansão e persistência em ambientes hospitalares. A detecção rápida de amostras resistentes aos carbapenêmicos e colistina, aliados a implementação de medidas mais eficazes de controle de infecção, são de importância crucial para evitar a disseminação de clones de alto risco de KP-KPC resistentes a colistina, como evidenciados nesse estudo.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC, resistência a colistina, virulência, produção de biofilme.

## ABSTRACT

The emergence of *Klebsiella pneumoniae* strains resistant to carbapenems and polymyxins (polymyxin B and colistin) is a threat to antimicrobial treatment. In this study, we investigated the molecular basis of colistin resistance in 23 *Klebsiella pneumoniae* KPC-producing strains (KPC-KP), of colonization and infection, from an outbreak that occurred in a public teaching hospital in Brazil. Whole genome sequencing (WGS) analysis was used to determine the mechanisms of resistance to colistin in a representative strain of each clone determined from the Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) technique. In addition, genotype analyzes were performed from the Polymerase Chain Reaction (PCR) for the following resistance genes (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *mcr-1*) and virulence (*fimH*, *fimA*, *wabG*, *khe*, *ecpA*, *entB*, *iutA*, *mrkD*, *rmpA*, *kfu*, *ybtS* and *allS*) and phenotypic experiments to evaluate the biofilm formation capacity (adhesion assay, viable cell quantification and biofilm formation) and the hypermucoviscosity (string test). This study evidenced concerns regarding the use of antibiotics, mainly broad-spectrum cephalosporins, carbapenems and polymyxins, which may be related to the emergence of colistin-resistant KPC-KP strains. In total, five patterns of clonal profiles were identified with most strains belonging to clone A (82.6%). The clonality study also showed that most recurrent infections were caused by the same strain that was previously colonizing or infecting, and was demonstrated the ability of multiple clones to coexist in the same patient. Among the sequenced strains (N = 4, clones A, B, C and D) different sequence types were observed, (STs: ST11, ST37, ST 340 and ST 1484). It was possible to observe a complex resistome with high frequencies of resistance and virulence genes, and together with phenotypic tests was documented the presence of highly virulent strains, being one also hypermucoviscous. In general, the strains were biofilm producers, regardless of colistin resistance, clonal profile and isolation site, increasing their persistence and making difficult eradication. For the first time in Brazil, a fragment of 3,055 base pairs inserted in the *mgrB* gene, composed of the insertion sequence *ISEcp1* and the gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in the 40KPC strain (representative of the dominant clone A) was identified, which resulted in acquired resistance concomitantly with broad-spectrum cephalosporins and colistin. The WGS allowed the identification of a species characterized as *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, highly virulent, hypermucoviscous and colistin-resistant, which may be another important reservoir of resistance genes. The aspects presented here reinforce *K. pneumoniae* as a successful pathogen in causing infections, resulting in its rapid expansion and persistence in hospital settings. Rapid detection of carbapenem and colistin-resistant strains, together with the

implementation of effective infection control measures, are crucial important in preventing the dissemination of high-risk clones of KP-KPC resistant to colistin, as evidenced in this study.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae* KPC-producing, resistance to colistin, virulence, biofilm production.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Organograma representativo do desenho do estudo e metodologias abordadas.....31
- Figura 2.** Dendrograma de perfis clonais do DNA de 23 amostras clínicas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase do tipo KPC (KP-KPC) resistentes a colistina baseado na eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....50
- Figura 3.** Diagrama construído utilizando o algoritmo goeBURST e visualizado no software Phyloviz (PHYLOVIZ Online) indicando a similaridade entre os *Sequence Types* (STs).....52
- Figura 4.** Representação esquemática do gene *mgrB* truncado pela sequência de inserção ISEcp1 juntamente com o gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> na amostra KPC40.....56
- Figura 5.** Avaliação do número de células aderidas, formação de biofilme e biomassa em sete amostras de *K. pneumoniae*.....61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Linhagens controle utilizadas em cada experimento.....	31
<b>Tabela 2.</b> Reagentes para realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	35
<b>Tabela 3.</b> Primers para amplificação dos genes de resistência das amostras de <i>K. pneumoniae</i> por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	36
<b>Tabela 4.</b> Primers para amplificação dos genes de virulência das amostras de <i>K. pneumoniae</i> por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	37
<b>Tabela 5.</b> Critérios para classificação da produção de biofilme.....	40
<b>Tabela 6.</b> Indicadores epidemiológicos, média DDD por 1000 pacientes-dia e frequência da mortalidade em 30 dias dos pacientes com KP-KPC na UTI de setembro de 2014 a setembro de 2016.....	44
<b>Tabela 7.</b> Características clínicas e demográficas de pacientes com infecção e/ou colonização causado por, pelo menos, uma cepa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase do tipo KPC (KP-KPC) resistente a colistina na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) no período de março de 2015 a julho de 2015.....	46
<b>Tabela 8.</b> Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para colistina, caracterização molecular dos determinantes de resistência aos carbapenêmicos e perfil clonal das amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de carbapenemase do tipo KPC (KP-KPC) resistentes a colistina na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) no período de setembro de 2014 a setembro de 2015.....	48
<b>Tabela 9.</b> Características do genoma das cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes a colistina pertencentes aos diferentes perfis clonais e número de acesso no Genbank.....	51
<b>Tabela 10.</b> Identidade média de nucleotídeos do genoma de <i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> (KP121) comparada a outros genomas de diferentes espécies de <i>Klebsiella</i> .....	53
<b>Tabela 11.</b> Genes de resistência as diferentes classes de antimicrobianos nas cepas de <i>K. pneumoniae</i> e <i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> resistentes a colistina.....	54

<b>Tabela 12.</b> Resultados cumulativos de várias mutações nos genes <i>pmrA</i> , <i>pmrB</i> , <i>phoP</i> , <i>phoQ</i> , <i>crrA</i> , <i>crrB</i> e alterações no gene <i>mgrB</i> nas cepas de <i>Klebsiella</i> sp. resistentes à colistina.....	55
<b>Tabela 13.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) para colistina, tamanho do gene <i>mgrB</i> e presença do gene <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> nas cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes a colistina.....	57
<b>Tabela 14.</b> Caracterização molecular e perfil de virulência dos 23 isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes a colistina.....	59
<b>Tabela 15.</b> Perfil de virulência dos quatro isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes a colistina sequenciados.....	61
<b>Tabela 16.</b> Classificação da formação de biofilme bacteriano pelo método de microtitulação em placa nas cepas clínicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<	Menor
>	Maior
≤	Maior ou igual
≥	Menor ou igual
°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i> ; Coleção de Cultura do Tipo Americana
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ; Ferramenta de Alinhamento de Busca Local
<b>CCIH</b>	Controle de Infecção Relacionadas à Assistência à Saúde
<b>CG</b>	Grupo/Complexo Clonal
<b>CGE</b>	<i>Center for Genomic Epidemiology</i> ; Centro de Epidemiologia Genômica
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CLSI</b>	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i> ; Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
<b>Col - R</b>	Resistente a Colistina
<b>Col - S</b>	Sensível a Colistina
<b>Contigs</b>	Sequências contíguas
<b>CTX-M</b>	Referência à enzima que hidrolisa preferencialmente cefotaxima
<b>DDD</b>	<i>Defined Daily Dose</i> ; Dose Diária Definida
<b>DNA</b>	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> ; Ácido Desoxirribonucleico
<b>DO</b>	Densidade ótica
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ; Ácido etileno-diamino tetracético



<b>ESBL</b>	<i>Extended-spectrum <math>\beta</math>-lactamase</i> ; $\beta$ -lactamases de amplo espectro
<b>et al</b>	E colaboradores
<b>F</b>	<i>Forward</i>
<b>HC-UFU</b>	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
<b>Hphv</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> hipervirulenta
<b>IMP</b>	Imipenem
<b>IRAS</b>	Infecções relacionadas à assistência à saúde
<b>IS</b>	<i>Insertion Sequence</i> ; sequência de inserção
<b>KPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
<b>KP-KPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de carbapenemases do tipo KPC
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>M<math>\beta</math>L</b>	Metallo- $\beta$ -lactamase
<b>MDR</b>	<i>Multidrug-Resistant</i> , Multirresistente
<b>MH</b>	<i>Mueller-Hinton</i>
<b>MIC</b>	<i>Minimum inhibitory concentration</i> , Concentração inibitória mínima
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MLST</b>	<i>Multilocus Sequence Typing</i> ; Tipagem por sequenciamento de multilocus
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i> ; Centro Nacional de Informação Biotecnológica
<b>NDM</b>	<i>New Delhi MBL</i>
<b>NGS</b>	<i>Next-generation sequencing</i> ; Sequenciamento de nova geração
<b>OXA</b>	Oxacilinas

<b><i>p</i></b>	Valor de <i>p</i>
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> ; Tampão fosfato-salino
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PFGE</b>	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> ; Eletroforese em gel de campo pulsado
<b>R</b>	<i>Reverse</i>
<b>RNA</b>	Ribonucleic Acid, Ácido Ribonucleico
<b>SD</b>	<i>Standard Desviation</i> ; Desvio Padrão
<b>SENTRY</b>	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i> ; Programa de vigilância antimicrobiana
<b>SLV</b>	<i>Single Locus Variant</i> ; Variantes de loco único
<b>STs</b>	<i>Sequence Types</i> ; Tipos de Sequências
<b>TBE</b>	<i>Tris, Borate and EDTA</i> ; Tris, Ácido bórico e EDTA
<b>TE</b>	Tris e EDTA
<b>TCSs</b>	Two-component Systems; Sistemas de Dois Componentes
<b>TSA</b>	<i>Tryptic Soy Agar</i> ; Ágar Triptona de Soja
<b>TSB</b>	<i>Tryptic Soy Broth</i> ; Caldo Triptona de Soja
<b>UFC/mL</b>	Unidade Formadora de Colônia/mililitro
<b>UPGMA</b>	<i>Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages</i> ; Uso de grupos pares não ponderados utilizando médias aritméticas
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva
<b>WGS</b>	<i>Whole-genome sequencing</i> ; Sequenciamento do genoma completo
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> ; Organização Mundial de Saúde
<b>β</b>	Beta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1 Hospital e Unidade de Terapia Intensiva (UTI) .....	30
3.2 Amostras bacterianas e desenho do estudo.....	30
3.3 Identificação das espécies e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos .....	32
3.4 Teste de Disco Difusão.....	32
3.5 Avaliação da resistência à Colistina pela técnica de Microdiluição em caldo (MD) .....	33
3.6 Definições.....	34
3.7 Comitê de Ética .....	35
3.8 Técnicas Moleculares .....	35
3.8.1 Detecção dos genes de resistência pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	35
3.8.2 Detecção dos genes de virulência pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	37
3.8.3 Avaliação da similaridade genética pela técnica de Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) e interpretação dos padrões moleculares .....	37
3.9 Avaliação fenotípica da produção de biofilme .....	39
3.9.1 Preparação do inóculo bacteriano.....	39
3.9.2 Ensaio de adesão a superfície inerte .....	39
3.9.3 Contagem de células viáveis no biofilme .....	39
3.9.4 Produção de biofilme.....	40
3.9.5 Classificação do biofilme .....	40
3.10 Avaliação fenotípica da hiper mucoviscosidade “string test” .....	41
3.11 Sequenciamento e montagem do genoma .....	41
3.11.1 Extração do DNA genômico e sequenciamento .....	41
3.11.2 Qualidade e montagem dos dados .....	41
3.11.3 Análises <i>in silico</i> .....	42
3.12 Análises Estatísticas .....	43
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>73</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>75</b>

<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>97</b>
<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA .....</b>	<b>98</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da incidência de bactérias Gram-negativas multirresistentes, com destaque para *Klebsiella pneumoniae*, é um problema global, consequência da habilidade desse microrganismo em adquirir resistência a quase todos os antimicrobianos disponíveis para tratamento, quer seja pela seleção de isolados com mutações em genes cromossômicos ou pela transferência horizontal de genes (GOOTZ, 2010; TANWAR et al., 2014; HOU et al., 2015; KATHRYN et al., 2015). Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde (IRAS) causadas por bactérias Gram-negativas resistentes aos antimicrobianos, como *K. pneumoniae*, resultam no aumento das taxas de morbidade e mortalidade, além de hospitalização prolongada e custos maiores quando comparadas àquelas causadas por cepas susceptíveis (KANG et al., 2005; GALES et al., 2012; TANWAR et al., 2014; GONÇALVES et al., 2016).

No Brasil, os problemas relacionados à resistência são ainda mais significativos, expressão da alta densidade do uso de antibióticos, principalmente de  $\beta$ -lactâmicos, inclusive os de última geração como os carbapenêmicos e fluorquinolonas (MOREIRA et al., 2013; PORTO et al., 2013; DANTAS et al., 2014; DANTAS et al., 2017; FERREIRA et al., 2018a). O consumo de antibióticos, particularmente o seu uso inapropriado, contribui diretamente para um pior prognóstico dos pacientes, bem como para a emergência e disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos nos hospitais, onde sua disseminação se torna mais fácil (TANGCHAROENSATHIEN et al., 2018; DU et al., 2019). Em microrganismos da família Enterobacteriaceae, a resistência aos carbapenêmicos está aumentando substancialmente no mundo todo, com esses microrganismos adquirindo múltiplos e sofisticados mecanismos de resistência (CDC, 2013; PEREZ; DUIN, 2013; IREDELL; BROWN; TAGG, 2016).

Entre os vários mecanismos de resistência de bacilos Gram-negativos, destaca-se a presença de carbapenemases, que são um grupo heterogêneo de  $\beta$ -lactamases incluindo: 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). Os genes que codificam as carbapenemases geralmente estão localizados em elementos genéticos móveis (plasmídeos), o que aumenta significativamente o risco de disseminação da enzima (GÜLMEZ et al., 2008; GOOTZ et al., 2010).

Atualmente, uma das principais carbapenemases em microrganismos da família Enterobacteriaceae é a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), que pertence à classe A de Ambler e ao grupo funcional 2f de Jacoby e Medeiros (QUEENAN; BUSH, 2007). O primeiro isolado produtor de KPC foi encontrado em uma amostra clínica de *K. pneumoniae* na Carolina do Norte (EUA) em 1996 (YIGIT et al., 2001), e atualmente esta enzima encontra-se disseminada globalmente (BEIRÃO et al., 2011; CASTANHEIRA et al., 2013; RUIZ-GARBAJOSA et al., 2013; LEE et al., 2016; VAN DUIN; DOI, 2017). No Brasil, a produção de KPC foi relatada em várias regiões, o que confirma sua disseminação e a endemicidade da enzima no país. (MONTEIRO et al., 2009; PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009; PEIRANO et al., 2009; GALES et al., 2012; PEREIRA et al., 2013). Outra importante penicilinase é a carbapenemase do tipo GES (*Guyana extended-spectrum*) que também é encontrada frequentemente em plasmídeos associada com determinantes de resistência às quinolonas (MONTEZZI et al., 2015).

KPC possui uma distribuição ampla e heterogênea, encontrada em mais de 115 diferentes *Sequence Types* (STs) (CHEN et al., 2014). Isolados de *K. pneumoniae* multirresistentes pertencentes ao grupo clonal (CG) 258, que compreendem os STs 258, 11 e outras variantes, merecem especial atenção devido a sua associação com a emergência e disseminação de KPC em diversos países (ANDRADE et al., 2011; CHEN et al., 2014; MARKOVSKA et al., 2015; KATHRYN et al., 2015; TOLENTINO et al., 2018). O ST258 é frequentemente encontrado na América Latina, América do Norte e na Europa, enquanto o ST11 prevalece na América Latina e Ásia (CHEN et al., 2014). Outros clones importantes incluem ST512, ST340 e ST437 (CHEN et al., 2014; TOLENTINO et al., 2018). No Brasil, o ST437 e ST11, variantes de locus único (SLV) do ST258, são frequentemente encontrados (SEKI et al., 2011; ANDRADE et al., 2011; NICOLETTI et al., 2012). Atualmente, a expansão clonal concomitante de STs e a transmissão de determinantes genéticos de resistência, estão produzindo uma mudança completa da epidemiologia de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo KPC (KP-KPC), sendo fundamental o monitoramento contínuo da epidemiologia desses isolados (BONURA et al., 2015).

Além da KPC, outras carbapenemases têm assumido importância epidemiológica, devido a sua associação com transposons, plasmídeos e integrons, com destaque para as metalo- $\beta$ -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).

A dificuldade no tratamento de infecções graves por bacilos Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos, como a KP-KPC, levou a reutilização das polimixinas (polimixina B e colistina) em nível mundial como última opção no tratamento dessas infecções (STEIN; RAOULT, 2002; FALAGAS; MICHALOPOULOS, 2006; BISWAS et al., 2012; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017). Devido ao aumento do uso desses antibióticos, já tem sido relatada resistência as polimixinas por bactérias que são normalmente susceptíveis a essas drogas (JOHANSEN et al., 2008; ARDUINO et al., 2012; MAMMINA et al., 2012; GONÇALVES et al., 2016), bem como relatos do aumento nas infecções causadas por bactérias naturalmente resistentes as polimixinas como *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* e *Serratia* (HAYAKAWA et al., 2012; MERKIER et al., 2013; SAMONIS et al., 2014; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017). Essas bactérias apresentam diversas maneiras de resistirem a estímulos ambientais adversos, incluindo a exposição a peptídeos antimicrobianos catiônicos como polimixina B e colistina. Essas estratégias incluem alterações nos lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), que geralmente apresentam cargas negativas, e são considerados os alvos ativos das polimixinas (MOFFATT et al., 2010).

O mecanismo de resistência as polimixinas não está completamente elucidado. A regulação gênica do desenvolvimento de resistência as polimixinas envolve sistemas de dois componentes - *Two-component Systems* (TCSs). A ativação de dois TCSs incluindo PhoP/PhoQ e PmrA/PmrB ocorre em diferentes condições ambientais e leva a mutações específicas e aumento da expressão de genes capazes de modificar o LPS bacteriano (BARROW; KNOW, 2009; MILLER et al., 2011; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017). Ambos os sistemas, PmrA/B e PhoP/Q, promovem modificações na expressão do operon *arnBCADTEF* responsável pela adição de 4-amino-arabinose no lipídio A, que leva a alteração do fenótipo para a resistência a polimixina (RAETZ et al., 2007; YAN; GUAN; RAETZ, 2007; MELETIS; SKOURA, 2018). Os genes que codificam esses dois sistemas são regulados pelos genes *mgrB* e *crrA/B* que codificam proteínas envolvidas na sua expressão, o gene *mgrB* regula negativamente a expressão de PhoP/Q e o sistema de dois componentes regulatório CrrA/B regula o sistema PmrA/B (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017). Alguns estudos mostram que esses sistemas podem estar envolvidos na resistência de *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* a este antimicrobiano (ADAMS et al., 2009; GUTU et al., 2013; CHOI; KO, 2013; CHENG et al., 2015).

Agravando ainda mais o problema da resistência a colistina, em 2015, foi relatado pela primeira vez, um novo mecanismo de resistência a essa droga transmitido via plasmídeo, podendo se espalhar de forma fácil e rápida entre as diferentes bactérias (LIU et al., 2016). Neste relato, Liu e colaboradores identificaram um novo gene de resistência (gene *mcr-1*) nas cepas de *Escherichia coli* e *K. pneumoniae* isoladas na China (LIU et al., 2016). O gene *mcr-1* codifica uma proteína integral de membrana de 60,1 kDa (541 aminoácidos) conhecida como MCR-1, uma fosfoetanolamina transferase, cuja função é catalisar a transferência de fosfoetanolamina (PEA) para o lipídio A no LPS bacteriano, reduzindo a carga negativa do lipídio A e, conseqüentemente, levando a uma menor afinidade de ligação das polimixinas (XU et al., 2018). Até o momento, nove variantes do gene foram descritas (*mcr-1* a *mcr-9*), demonstrando uma ampla disseminação desse gene entre os membros da família Enterobacteriaceae de origens humana, animal e ambiental (LIU et al., 2016; XAVIER et al., 2016; ROER et al., 2017; BOROWIAK et al., 2017; CARRETTO et al., 2018; ABUOUN et al., 2018; YANG et al., 2018; WANG et al., 2018; CARROLL et al., 2019). No Brasil, este gene foi identificado pela primeira vez no ano de 2016, em uma cepa de *E. coli* e desde então muitos relatos de produtores de *mcr* foram reportados no país, sendo a variante do tipo um a mais identificada (FERNANDES et al., 2016; DALMOLIN et al., 2017; PALMEIRA et al., 2018; PERDIGÃO NETO et al., 2019).

Embora os estudos sobre o entendimento dos mecanismos de resistência a colistina tenham avançado consideravelmente, o destaque ainda tem sido a descoberta de inativações insercionais no gene *mgrB* como a fonte de resistência à colistina em *K. pneumoniae* (POIREL et al., 2015; JAYOL et al., 2016; SONNEVEND et al., 2017; SHANKAR et al., 2019). O gene *mgrB* codifica uma pequena proteína transmembrana de 47 aminoácidos que regula negativamente o sistema PhoP/PhoQ sendo parte de um *loop* de *feedback* negativo no circuito de sinalização desse sistema (POIREL et al., 2015). Estudos prévios tem reportado alterações no gene *mgrB* como o principal mecanismo de resistência as polimixinas no Brasil e no mundo (POIREL et al., 2015; AIRES et al., 2016; BRAUN et al., 2018; HUICHUAN et al., 2018; PITT et al., 2018). Dois estudos recentes mostraram a inativação do gene causada pela inserção da sequência (*ISEcpI*) juntamente com um gene de resistência, em um deles o gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> que codifica uma beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), e no outro o gene da carbapenemase *bla*<sub>OXA-181</sub>, resultando na resistência a dois importantes agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções graves causadas por microrganismos Gram-negativos, cefalosporinas/carbapenêmicos e colistina (JAYOL et al., 2016; SONNEVEND et al., 2017).



Embora a resistência a colistina seja relativamente rara, relatos de surtos de *K. pneumoniae* resistente a colistina aumentaram na última década no mundo todo (MARCHAIM et al., 2011; GIANI et al., 2015; GONÇALVES et al., 2016; HALABY et al., 2016; GUDUCUOGLU et al., 2018). No Brasil, o primeiro relato sobre a resistência à colistina em *K. pneumoniae* ocorreu em 2006, com uma taxa de 1,8% (GALES; JONES; SADER, 2006). Posteriormente, Pereira e colaboradores (2013) relataram taxas de 15% de resistência às polimixinas em amostras de KP-KPC em diversos estados do país (PEREIRA et al., 2013). Dados preocupantes dessa resistência foram descritos na cidade de São Paulo, onde foi demonstrada uma taxa de resistência de 27,1% em amostras de KP-KPC (BARTOLLETTI et al., 2016). Tão preocupante quanto, foi a descrição de um surto de KP-KPC resistente a colistina no HC-UFU, em que a transmissão cruzada entre os pacientes ficou clara pelas relações temporal e espacial observadas, além da associação com o alto consumo antibióticos (GONÇALVES et al., 2016).

Esse alto consumo de antibióticos é bem evidenciado no país, particularmente de cefalosporinas de espectro estendido, carbapenêmicos e fluorquinolonas determinando que a pressão seletiva provocada pelo uso indiscriminado desses antimicrobianos, está intimamente relacionada com a emergência e disseminação de cepas altamente resistentes (MOREIRA et al., 2013; PORTO et al., 2013; DANTAS et al., 2014; DANTAS et al., 2017; FERREIRA et al., 2018a), como aquelas produtoras de ESBL (ROCHA; PINTO; BARBOSA et al., 2016). No Brasil, nos últimos anos, as enzimas ESBL da família CTX-M tiveram uma expansão acentuada e uma ampla diversidade de genótipos relacionados ao gene *bla*<sub>CTX-M</sub> em *Klebsiella pneumoniae* tem sido detectada em diferentes hospitais (CHAGAS et al., 2011; SAMPAIO, GALES, 2016; ROCHA et al., 2019), com um predomínio de CTX-M-2 e CTX-M-15 (ROCHA; PINTO; BARBOSA et al., 2016).

Os múltiplos mecanismos de resistência aos antimicrobianos associados aos diversos fatores de virulência expressos pelas cepas de *K. pneumoniae*, são uma preocupação mundial e sua identificação precoce é essencial para o tratamento adequado dos pacientes infectados e para o controle de infecções (DERAKHSHAN; NAJAR PEERAYEH; BAKHSHI; 2016; GONÇALVES et al., 2017). O perfil de patogenicidade de *K. pneumoniae* deve-se a vários fatores de virulência que permitem superar a resposta imunológica do hospedeiro e causar infecções. Entre estes vários fatores, destacam-se: presença de cápsula, hipermucoviscosidade, lipopolissacarídeos, adesinas, sistemas de aquisição de ferro (sideróforos) e formação de biofilme (YU et al., 2007; KHAERTYNOV et al., 2018).

*K. pneumoniae*, particularmente as cepas invasivas, possuem uma cápsula polissacarídica que auxilia na sobrevivência e evasão imune durante a infecção (LI et al., 2014). A maior produção de lipopolissacarídeos capsular e a presença de uma cápsula mais espessa na superfície da célula estão associadas a alguns sorotipos de *K. pneumoniae*, particularmente os sorotipos capsulares K1 e K2, que são altamente virulentos e estão frequentemente associados à infecções graves (BRISSE et al., 2009; PACZOSA; MECSAS, 2016).

Outros importantes fatores de virulência descritos nas cepas de *K. pneumoniae*, são os genes que codificam sideróforos e reguladores do fenótipo mucóide. A presença de ferro é fundamental para o crescimento e patogênese de *K. pneumoniae*, algumas bactérias secretam substâncias quelantes, denominadas de sideróforos, a partir de sistemas de aquisição de ferro, como as aerobactinas (*iucABC/iutA*), enterobactinas (*entB*), salmochelinas e yersiniabactina (*ybtS*), que solubilizam o ferro e auxiliam na importação deste ferro livre para a região citoplasmática do microrganismo (BRISSE et al., 2009), permitindo que a bactéria lide com escassez de ferro nos hospedeiros (LI et al., 2014).

É importante ressaltar também, que para a sobrevivência e desenvolvimento de infecção, a presença de estruturas protéicas denominadas fimbrias são fundamentais. *K. pneumoniae* produz dois principais tipos de fimbrias, as fimbrias do tipo 1 (*fimABCDEFGHJK*) e as do tipo 3 (*mrkABCDEFHJ*), e estão relacionadas a capacidade da bactéria aderir nas mucosas do hospedeiro (SCHEMBRI et al., 2005; STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2008). As fimbrias do tipo 3 promovem ligação às células endoteliais e dos epitélios respiratório e renal, através da adesina MrkD, e tem papel importante na formação de biofilmes (JAGNOW; CLEGG, 2003).

Outros importantes fatores de virulência também são estudados em *K. pneumoniae* como o *pilus* comum de *E. coli* (ECP), codificado pelo gene *ecpA*; hemolisina, codificada pelo gene *khe*; gene que atua como regulador transcricional positivo da síntese de polissacarídeos capsulares (*rmpA*); gene envolvido na biossíntese do núcleo lipopolissacarídeo (*wabG*); genes associados ao metabolismo de alantoína (*allABCDS*) e a síntese de urease (*ureADE*) (NUNES, 2009; LI et al., 2014; ARAÚJO et al., 2018). Foi demonstrado na literatura que as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL apresentam uma maior expressão de fatores de virulência que podem resultar no desenvolvimento de infecções mais graves (GUPTA et al., 2003). O aumento da incidência de amostras de *K. pneumoniae* resistentes a múltiplos antimicrobianos, particularmente em amostras produtoras de KPC e ESBLs, incluindo amostras do Brasil, fazem com que a determinação dos

mecanismos de virulência desses patógenos seja importante (GONÇALVES et al., 2017; ARAÚJO et al., 2018).

Além dos vários fatores de virulência que essas cepas apresentam, recentemente, o surgimento de *K. pneumoniae* caracterizadas como hipervirulentas (Kphv) estão preocupando ainda mais a comunidade científica (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017; DANXIA GU et al., 2017; SHANKAR et al., 2018; RUSSO; MARR, 2019). Embora as características genéticas das amostras de Kphv sejam diversas, alguns autores consideram como cepas hipervirulentas aquelas que são positivas para o gene *rmpA* (regulador do fenótipo mucóide A), e/ou presença do gene de aerobactina, além de ter o fenótipo hipermucoviscoso que é confirmado pela formação de um filamento viscoso ( $\geq 5$  mm) após tocar uma colônia em uma placa de ágar TSA, no chamado *string test* (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017). Discussões mais recentes, baseadas nos estudos do sequenciamento de plasmídeos, têm mostrado que a caracterização de cepas hipervirulentas pode estar associada a presença de plasmídeos de virulência, como por exemplo, os plasmídeos pK2044 e pLVPK que abrigam os principais genes de virulência, como *rmpA* e aqueles que codificam sideróforos (por exemplo, *iroBCDN*, *iucABCD*, *iutA*), entre outros, conferindo fenótipo hipervirulento. (RUSSO et al., 2018; RUSSO; MARR, 2019).

A avaliação da formação de biofilme em cepas de *K. pneumoniae* também tem sido motivo de interesse pelos pesquisadores que estudam a epidemiologia desse microrganismo (CAMPOS et al., 2016; ARAÚJO et al., 2018; FERREIRA et al., 2018a; FU et al., 2018; ZHENG et al., 2018). A capacidade de *K. pneumoniae* formar biofilme protege o patógeno dos mecanismos de defesa do hospedeiro assim como dos antibióticos, aumentando sua persistência no tecido epitelial e superfícies de dispositivos médicos (VUOTTO et al., 2014; CHUNG, 2016).

A literatura mostra que a formação do biofilme tem como primeira etapa interações físico-químicas que permitem a adesão das células diretamente à superfície. Embora essas interações não específicas iniciais sejam importantes, a adesão estável à superfície depende de interações específicas entre as adesinas da parede celular dos microrganismos e macromoléculas do ambiente. Esta adesão é quase sempre mediada por polímeros extracelulares. Apêndices celulares externos, como flagelos, fimbrias e pili, também desempenham papel significativo na adesão celular inicial, além de formarem pontes entre as células e a superfície (LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013; FOSTER et al., 2014). O contato com a superfície e a instalação microbiana, é seguido pela fase de crescimento e

divisão celular. Material extracelular é agregado fortalecendo as ligações entre as células e a superfície, e dentro de dias a meses, a adesão de outros microrganismos é facilitada, bem como a liberação de novos colonizadores capazes de formar novos biofilmes, que se desprendem do biofilme maduro iniciando novo ciclo (OTTO, 2008; 2009; 2013).

O tratamento de infecções associadas aos biofilmes é especialmente problemático, uma vez que utilizando uma variedade de mecanismos, bactérias em biofilmes podem ser de 10 a 1000 vezes mais resistentes a antibióticos quando comparadas às células planctônicas (MAH; O'TOOLE, 2001; GIRARD et al., 2010; HENGZHUANG et al., 2011; CHUNG, 2016). Além dessa dificuldade, a frequência crescente de resistência aos antibióticos entre as bactérias formadoras do biofilme torna o tratamento ainda mais difícil (KWON et al., 2008; CHUNG, 2016; FERREIRA et al., 2018a). No Brasil, poucos estudos têm sido realizados demonstrando a importância da capacidade de formação de biofilme em cepas clínicas multirresistentes utilizando metodologias laboriosas que avaliam estatisticamente a adesão bacteriana, a quantidade de células no biofilme e a formação de biofilmes (CAMPOS et al., 2016; ARAÚJO et al., 2018; FERREIRA et al., 2018a). Dessa forma, o conhecimento detalhado sobre a formação de biofilmes em bactérias epidemiologicamente importantes é necessário para o conhecimento da evolução das infecções.

Nos últimos anos, no HC-UFU, tem sido destacada a disseminação de diferentes variantes de *K. pneumoniae*, epidêmicas e endêmicas, frequentemente associada com virulência e produção de biofilme, que podem conferir maior vantagem adaptativa e a emergência de novos genótipos de resistência aos antimicrobianos (CAMPOS et al., 2016; ARAUJO et al., 2018; FERREIRA et al., 2018a; FERREIRA et al., 2018b; GONÇALVES et al., 2018). Estudos capazes de utilizar abordagens moleculares para esclarecimento de questões relevantes, como a plasticidade genética dos clones epidêmicos de alto risco tem sido de grande importância. Assim, os métodos de tipagem molecular, como “*Pulsed Field Gel Electrophoresis*” (PFGE), são fundamentais para determinar se microrganismos epidemiologicamente importantes, são geneticamente relacionados, auxiliando na detecção de surtos, na identificação das vias de transmissão e fontes de infecção. A técnica de PFGE é amplamente utilizada para classificação das amostras em linhagens clonais no decorrer de investigações de epidemiologia molecular, considerando o seu alto poder discriminatório, tipabilidade e reprodutibilidade (BLANC, 2004; GOERING, 2010; NSOFOR, 2016).

Adicionalmente, o sequenciamento completo do genoma bacteriano tornou-se uma ferramenta importante na tipagem de bactérias, pois fornece um conjunto de informações sobre a identificação do patógeno, tipagem epidemiológica e susceptibilidade aos

antimicrobianos, que só seriam alcançadas através da associação de múltiplas técnicas. Essas informações são importantes e permitem o estudo de epidemias mundiais, surtos regionais, determinação de redes de transmissão, e melhor compreensão da disseminação filogenética de agentes infecciosos como *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (SNITKIN et al., 2012; MATHERS et al., 2015).

A importância do sequenciamento completo no estudo dos genomas bacterianos pode ser exemplificada com a identificação de bactérias epidemiologicamente importantes em nível de subespécies (BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014). As diferentes subespécies de *K. pneumoniae* só podem ser identificadas de forma confiável com base nessa metodologia ou no sequenciamento de marcadores genéticos específicos (LONG et al., 2017; NICOLAS et al., 2018). No entanto, esses métodos não estão disponíveis para a grande maioria dos laboratórios de rotina e são limitados em termos de tempo, pessoal treinado para execução e custo. Hoje, os métodos tradicionais utilizados em microbiologia clínica não são capazes de distinguir subespécies filogeneticamente relacionadas a *K. pneumoniae*, levando a muitos erros de identificação (FONSECA et al., 2017; LONG et al., 2017).

Embora a *K. pneumoniae* seja a espécie clinicamente mais relevante dentro do gênero, recentemente, o surgimento e a descrição de subespécies filogeneticamente relacionadas, como *K. quasipneumoniae* e *K. variicola*, apresentando características tão virulentas quanto às cepas de *K. pneumoniae* tem chamado a atenção (LONG et al., 2017; NICOLAS et al., 2018), pois apresentam um risco potencial, podendo ser novos reservatórios com capacidade de propagação de genes de virulência e de resistência a múltiplos fármacos entre as várias espécies de *Klebsiella* (MATHERS et al., 2019). Dentro da espécie *Klebsiella pneumoniae* há uma classificação em três grupos filogenéticos que correspondem às subespécies: *K. pneumoniae* (KpI), *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (KpII-A) *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (KpII-B) e *Klebsiella variicola* (KpIII) (BRISSE; VERHOEF, 2001; LONG et al., 2017), sendo que a presença dos genes que codificam as  $\beta$ -lactamases *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OKP-A</sub>/*bla*<sub>OKP-B</sub> e *bla*<sub>LEN</sub>, está diretamente associado a cada um desses grupos, respectivamente (HAEGGMAN et al., 2004; FONSECA et al., 2017). Ainda não está claro a real importância clínica que essas subespécies apresentam, sendo assim, a caracterização genômica dessas cepas possibilita a correta identificação e o conhecimento das características dessas subespécies contribuindo para melhoria dos diagnósticos e para o entendimento da sua relevância epidemiológica.

Sendo assim, considerando-se todos os desafios apresentados na terapêutica das infecções causadas por cepas de KP-KPC resistentes a colistina, a determinação da

diversidade genética de microrganismos causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde permite criar estratégias de prevenção e controle, bem como terapêuticas para evitar a disseminação de patógenos inter e intra-hospitalar e para outros ecossistemas.

## 2. OBJETIVOS

Considerando a necessidade de realizar estudos que permitam compreender melhor os mecanismos de resistência, virulência e a formação de biofilme em cepas clínicas de KP-KPC resistentes a colistina foram propostos os seguintes objetivos:

- Avaliar a relação do consumo de antibióticos na UTI (HC-UFU) através da dose diária definida (DDD) por 1000 pacientes-dia de antimicrobianos, pertencentes às classes de cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração, carbapenêmicos, fluorquinolonas e polimixinas com o surgimento de cepas resistentes a colistina;
- Avaliar se as infecções por KP-KPC resistentes a colistina foram recidivas de uma mesma cepa;
- Determinar a relação clonal entre as linhagens de KP-KPC resistentes a colistina por meio de PFGE;
- Determinar a sequência completa do genoma das cepas de KP-KPC resistentes a colistina dos diferentes clones determinados previamente por PFGE; consequentemente caracterizar o resistoma e o *Sequence Type* (ST) dessas cepas;
- Investigar a presença de mutações que conferem resistência a colistina nos genes *pmrA/B*, *phoP/Q*, *crrA/B* e *mgrB* nas cepas de KP-KPC resistentes a colistina que tiveram seus genomas sequenciados;
- Determinar por PCR a presença dos genes de resistência *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>* e *mcr-1*; e de virulência *fimH*, *fimA*, *wabG*, *iucC*, *rmpA*, *ecpA*, *mrkD*, *khe*, *entB*, *kfU*, *ybtS*, *allS* e *iutA* nas amostras de KP-KPC resistentes a colistina bem como avaliar o fenótipo de hiper mucoviscosidade;
- Verificar por experimentos fenotípicos a capacidade de formação de biofilme entre as amostras de KP-KPC resistentes a colistina de diferentes perfis clonais determinados por PFGE e sítios de isolamento;
- Avaliar a relação entre amostras resistentes a colistina de colonização e infecção e a produção de biofilme;

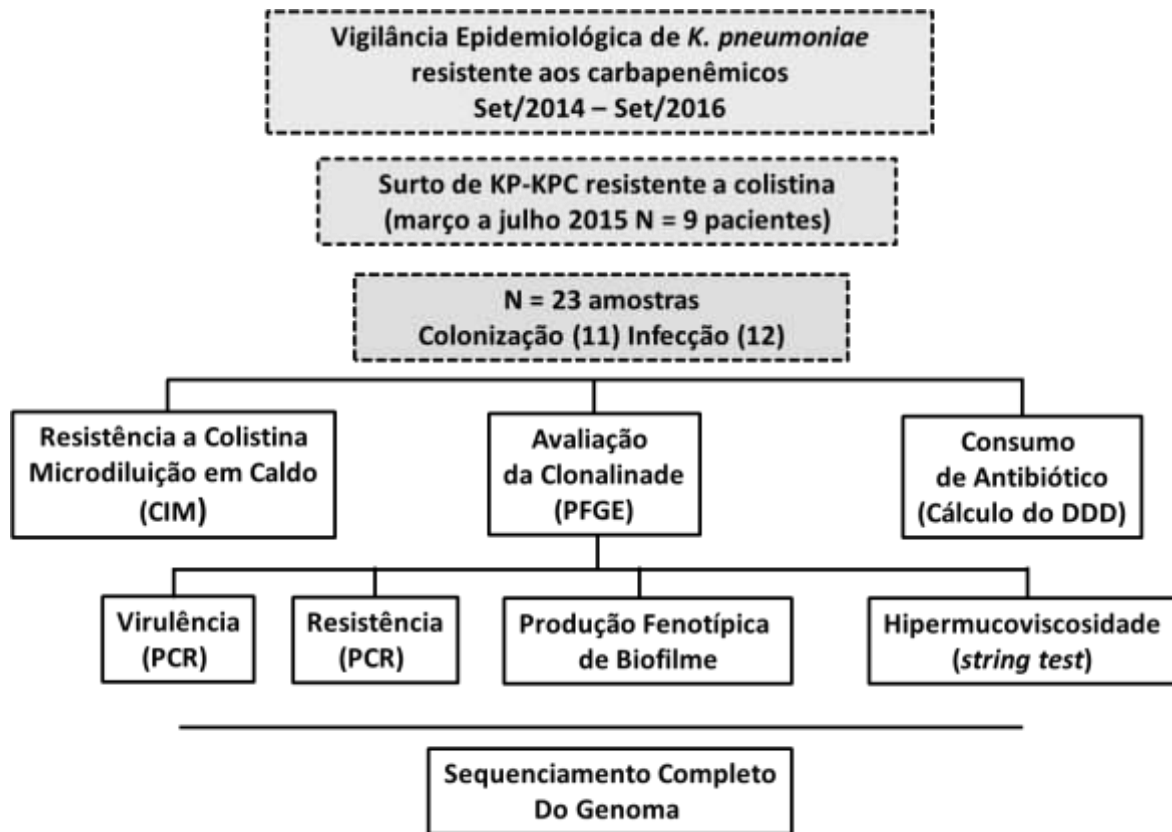
### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Hospital e Unidade de Terapia Intensiva (UTI)**

O Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) é um complexo hospitalar público, universitário, de assistência terciária e com capacidade para 530 leitos e apresenta uma Unidade de Terapia Intensiva de Adultos mista, com um total de 30 leitos. É referência para uma população estimada de mais de dois milhões de habitantes, moradores de Uberlândia e de 81 municípios das regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Nos últimos anos, tem sido responsável por praticamente todo o atendimento hospitalar vinculado ao Sistema Único de Saúde (SUS) do município de Uberlândia. Possui clínicas de várias especialidades e, por ser um hospital de alta complexidade que atua como referência regional, grande parte dos seus pacientes exige cuidados complexos.

#### **3.2 Amostras bacterianas e desenho do estudo**

Nos meses de março a julho de 2015 ocorreu um importante surto de *K. pneumoniae* resistente a colistina na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do HC-UFU. As amostras foram recuperadas e selecionadas para as análises microbiológicas e moleculares, e os dados epidemiológicos dos pacientes foram investigados a partir dos prontuários médicos. A figura 1 ilustra um organograma representativo do desenho do estudo e as metodologias abordadas. As cepas controle que foram utilizadas em cada experimento estão descritas na tabela 1.



**Figura 1.** Organograma representativo do desenho do estudo e metodologias abordadas.

**Tabela 1.** Linhagens controle utilizadas em cada experimento

Linhagem controle	Experimento
<i>K. pneumoniae</i> Kp 740/11	PCR para os genes <i>fimH</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC</sub>
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA2156	PCR para o gene <i>bla</i> <sub>NDM</sub>
<i>P. aeruginosa</i> 101-4704	PCR para o gene <i>bla</i> <sub>IMP</sub>
<i>P. aeruginosa</i> A1254	PCR para o gene <i>bla</i> <sub>VIM</sub>
<i>E. coli</i> Col-R	PCR para o gene <i>mcr-1</i> e MIC
<i>K. pneumoniae</i> MGH-78578	PCR para os genes <i>fimA</i> , <i>mrkD</i>
<i>E. coli</i> ATCC 55989	PCR para o gene <i>iucC</i>
<i>E. coli</i> ATCC 8739	PCR para o gene <i>ecpA</i>
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044	PCR para os genes <i>khe</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i> , <i>wabG</i> , <i>rmpA</i>
<i>K. pneumoniae</i> 40KPC (deste trabalho)	PCR para os genes <i>entB</i> , <i>iutA</i> , <i>ybtS</i>
<i>K. pneumoniae</i> 121KP (deste trabalho)	PCR para os genes <i>allS</i> e <i>Kfu</i>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	MIC
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044	Biofilme



### 3.3 Identificação das espécies e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

A identificação e os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados pelo Laboratório de Microbiologia do HC-UFU, utilizando o sistema automatizado VITEK 2® (bioMérieux), exceto para as amostras de colonização. De acordo com o laboratório, as culturas testes foram suspensas em solução salina 0,45% com objetivo de obter uma suspensão com turbidez compatível com a escala de 0,50 a 0,63 de McFarland utilizando turbidímetro. Em seguida, os cartões foram inseridos no aparelho e cada teste bioquímico foi preenchido, selado e incubado. Durante o período de incubação (7-10 horas) os cartões foram lidos a cada 15 minutos através de um sistema óptico de transmitância usando diferentes comprimentos de onda no espectro visível. Os resultados foram analisados através de algoritmos pelo software do aparelho e reportados automaticamente.

Para os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, os cartões foram inseridos no aparelho e automaticamente preenchidos com as suspensões bacterianas. No cartão, os antimicrobianos são encontrados em duas a quatro concentrações diferentes. Cada poço com o antibiótico teste foi avaliado automaticamente a cada 15 minutos durante 18 horas de maneira a gerar uma curva de crescimento e, por comparação com um controle, a concentração inibitória mínima (CIM) de cada antibiótico foi estimada. Esse cálculo foi realizado com um algoritmo específico para cada antimicrobiano.

A resistência aos seguintes antimicrobianos foi avaliada: amoxicilina + clavulanato, amicacina, ampicilina, cefepime, cefoxitina, ceftriaxona, ciprofloxacina, gentamicina, levofloxacina, piperacilina + tazobactam, tigeciclina, ertapenem, imipenem, meropenem e colistina. As amostras bacterianas identificadas foram preservadas a -80°C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) acrescido de 15% de glicerol.

### 3.4 Teste de Disco Difusão

Para as amostras de *K. pneumoniae* recuperadas de colonização, não é rotina fazer os testes de suscetibilidade para todos os antimicrobianos pelo método automatizado. O sistema automatizado VITEK®2 apresentou resultados para os antimicrobianos colistina e carbapenêmicos, enquanto os demais foram realizados pelo teste de disco difusão, no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU, de acordo com o CLSI (2014).

Os discos testados e suas respectivas concentrações foram: amoxicilina + clavulanato (10 µg), amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), cefepime (30 µg), cefoxitina (30 µg),

ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), gentamicina (10 µg), piperacilina + tazobactam (10 µg), ertapenem (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg).

Para a realização deste teste foi utilizado o ágar Mueller-Hinton (MH), esterilizado em autoclave e distribuído em placas de Petri. O inóculo bacteriano foi preparado em solução salina estéril 0,9% a partir de uma cultura com 16-18 horas de crescimento e ajustado para uma turvação correspondente ao tubo nº 0,5 da escala de McFarland. Essa suspensão bacteriana foi semeada no ágar MH com um *swab* estéril, esfregando-o em toda superfície do meio de cultura. Em seguida, os discos de antimicrobianos foram distribuídos com auxílio de uma pinça estéril. As placas foram incubadas a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , a leitura foi feita após 24-48 horas de incubação e os halos de inibição do crescimento foram medidos e comparados de acordo com o CLSI (2014), classificando as amostras como sensíveis, intermediários ou resistentes.

### **3.5 Avaliação da resistência à Colistina pela técnica de Microdiluição em caldo**

O experimento para a confirmação da resistência a colistina foi realizado no Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia (Micromol-UFU). As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas para todas as 23 amostras, seguindo as normas padronizadas pelo CLSI (2015) e EUCAST (2017). O antimicrobiano colistina foi dissolvido no diluente apropriado e, a partir da solução estoque, foram feitas diluições para obtenção da solução inicial adequada, o ensaio foi preparado em duplicata. 100µL do antimicrobiano preparado a uma concentração acima da concentração inicial desejada na microplaca de 96 poços, foi colocado na primeira coluna. Adicionalmente, 100µL de caldo Mueller-Hinton (CMH) foi pipetado em todos os demais poços, exceto os da primeira coluna. A seguir, foi realizada uma diluição seriada do antimicrobiano (256µg/mL – 0,125µg/mL), sendo pipetado 100uL do volume da primeira coluna e passada para os poços das colunas seguintes com homogeneização em todos os poços. Depois dessa etapa, foi adicionado 80uL de CMH em todos os poços e, por fim, 20uL das suspensões bacterianas preparadas segundo a escala 0,5 de McFarland. Após inoculação, as placas foram fechadas e incubadas a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18 a 20 horas. Como controle de esterilidade foi utilizado uma coluna sem adição da suspensão bacteriana, e como controle negativo do ensaio foi utilizada a cepa ATCC25922. A leitura das microplacas foi realizada em local com boa iluminação, através de observação macroscópica do crescimento bacteriano.

### 3.6 Definições

**Uso prévio de antibióticos:** foi considerado quando o paciente recebeu terapia com qualquer antibiótico durante pelo menos 72 horas observada em um período de até 30 dias prévio ao diagnóstico microbiológico da infecção (DANTAS, 2015).

**Mortalidade hospitalar (30 dias):** evolução para o óbito em até 30 dias após o diagnóstico da infecção (LODISE et al., 2007).

**Dose Diária Definida de antimicrobiano por 1000/pacientes-dia (DDD/1000 pacientes-dia):** foram selecionados para cálculos das densidades de uso por 1000 pacientes/dia os seguintes antibióticos: Fluorquinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina); Polimixinas (Polimixina B/Colistina); Carbapenêmicos (Imipenem, Meropenem e Ertapenem) e Cefalosporinas (Ceftriaxone e Cefepime), conforme recomendando pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000). A densidade de uso (DDD por 1000 pacientes-dia) foi obtida pela fórmula:

$$\text{DDD} = \frac{\text{Consumo de antibióticos em gramas}}{\text{Dose diária definida (NNIS, 2004)}}$$

$$\text{DDD/1000 pacientes-dia} = \frac{\text{DDD}}{\text{N}^\circ \text{ de pacientes-dia}^*} \times 1000$$

\*Pacientes-dia: P x L x T

P = Período de tempo em observação, em dias.

L = Leitos disponíveis na unidade.

T = índice de ocupação no tempo considerado (%).

### 3.7 Comitê de Ética

As amostras utilizadas nesse estudo foram recuperadas durante a vigência do projeto 224/09 e 44734115.2.0000.5152, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (ANEXO A).

### 3.8 Técnicas Moleculares

#### 3.8.1 Detecção dos genes de resistência pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para avaliar a presença dos genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *mcr-1* foram realizadas as técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional com *primers* consensos para cada gene. Foram utilizados reagentes para um volume final de reação de 25 µL, conforme descrito na Tabela 2. Os *primers* utilizados nas reações estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 2.** Reagentes para realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Reagentes	Volume	Concentração final
DNA <sup>1</sup>	-	-
<i>primer forward</i> (10 uM)	0,75 µL	0,3 µM
<i>primer reverse</i> (10 uM)	0,75 µL	0,3 µM
GoTaq® Green Master Mix, 2x	12,5 µL	1x
Água ultrapura autoclavada	q.s.p. <sup>2</sup> 25 µL	n.a. <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Parte de uma colônia bacteriana isolada; <sup>2</sup> quantidade suficiente para; <sup>3</sup> não se aplica.

**Tabela 3.** *Primers* para amplificação dos genes de resistência das amostras de *K. pneumoniae* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Gene <sup>1</sup>	Seqüência (5'- 3') <sup>2</sup>	Temp. de Anelamento <sup>3</sup> (°C)	Produto Amplificado (pb)
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	F: GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC R: GGTTTAAAYAAAACAACCACC	52	232
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	F: GATGGTGTTTGGTCGCATA R: CGAATGCGCAGCACCAG	52	390
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	F: GTATCGCCGTCTAGTTCTGCTG R: GTTGACGCCCAATCCCTCGA	54	860
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	F: ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC R: TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG	58	593
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	F: GGGCAGTCGCTTCCAACGGT R: GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT	60	475
<i>mcr-1</i>	F: CGGTCAGTCCGTTTGTTC R: CTTGGTCGGTCTGTGTA GGG	56	1626

<sup>1</sup>Referências: *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>VIM</sub>: POIREL et al., 2011; *bla*<sub>KPC</sub>: GALETTI, 2010; *bla*<sub>CTX-M</sub>: MONSTEIN et al., 2007; *bla*<sub>NDM</sub>: SHENOY; JYOTI; RAYIKUMAR, 2014; *mcr-1*: LIU et al., 2016; <sup>2</sup>F, *Forward*; R, *Reverse*; <sup>3</sup>Temperatura de Anelamento.

A amplificação foi realizada no termociclador Eppendorf Mastercycler®, programado de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; seguido de 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos; anelamento à temperatura específica de cada primer por 1 minuto (Tabela 3), extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos amplificados da técnica de PCR foram submetidos a técnica de eletroforese sob as seguintes condições de corrida: 90V durante 60 minutos em gel de agarose 1,5%, no tampão TBE (Tris, Ácido bórico e EDTA) [0,5x]. O gel foi corado com 5 µL de SYBER® Safe (Applied Biosystems®) para cada 100 mL de tampão e fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia®).

### 3.8.2 Detecção dos genes de virulência pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A detecção dos genes de virulência foi realizada por PCR, e os *primers* utilizados nas reações estão descritos na Tabela 4. A amplificação, análise dos produtos da reação, eletroforese e documentação do gel foram realizadas como descrito no item anterior.

**Tabela 4.** *Primers* para amplificação dos genes de virulência das amostras de *K. pneumoniae* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Gene <sup>1</sup>	Seqüência (5'-3') <sup>2</sup>	Temp. de Anelamento <sup>3</sup> (°C)	Produto Amplificado (pb)
<i>ecpA</i>	F: GCAACAGCCAAAAAAGACACC R: CCAGGTCGCGTCGAACTG	52	477
<i>fimA</i>	F: CGGACGGTACGCTGTATTTT R: GCTTCGGCGTTGTCTTTATC	50	500
<i>wabG</i>	F: CGGACTGGCAGATCCATATC R: ACCATCGGCCATTTGATAGA	50	683
<i>rmpA</i>	F: GCAGTTAACTGGACTACCTCTG R: GTTTACAATTCGGCTAACATTTTTCTTTAAG	50	322
<i>fimH</i>	F: CACGCAAGGCACCATTC R: GCTCAGAATCAACATCGGTAAC	55	900
<i>iucC</i>	F: AAACCTGGCTTACGCAACTGT R: ACCCGTCTGCAAATCATGGAT	56	400
<i>Khe</i>	F: ACCGTCCTGCCCCGATTTAAT R: GATAAACCACAGGCGCATAGTG	56	600
<i>mrkD</i>	F: TTGTTGCTGCTGGTTTGGTTC R: CGAGTTTCCTGGCTTTGTAATG	53	600
<i>entB</i>	F: GTCAACTGGGCCTTTGAGCCGTC R: TATGGGCGTAAACGCCGGTGAT	64	400
<i>Kfu</i>	F: GGCCTTTGTCCAGAGCTACG R: GGCCTTTGTCCAGAGCTACG	59	638
<i>ybtS</i>	F: GACGGAAACAGCACGGTAAA R: GAGCATAATAAGGCGAAAGA	53	242
<i>allS</i>	F: CATTACGCACCTTTGTCAGC R: GAATGTGTCGGCGATCAGCTT	57	764
<i>iutA</i>	F: GGGAAAGGCTTCTCTGCCAT R: TTATTCGCCACCACGCTCTT	56	920

<sup>1</sup>Referências: *ecpA* e *fimA*: ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013; *wabG*: CHEN et al., 2014; *rmpA*: FANG et al., 2007; *fimH*: STAHLHUT et al., 2009; *iucC*: USEIN et al., 2001, *khe* e *mrkD*: NUNES, 2009; *entB*, *kfu*, *ybtS*, *allS*, *iutA*: COMPAIN et al., 2014; <sup>2</sup>F, Forward; R, Reverse; <sup>3</sup>Temperatura de Anelamento.

### 3.8.3 Avaliação da similaridade genética pela técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e interpretação dos padrões moleculares

As de *K. pneumoniae* resistentes a colistina foram analisadas por PFGE conforme metodologia padronizada no Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia (MICROMOL-UFU).

Uma colônia de cada bactéria foi inoculada em 3 mL de caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*) e incubada a 37°C durante 24 horas, sob agitação de 200 rpm. A concentração celular foi ajustada com o caldo TSB para valores entre 0,9 a 1,10, na OD<sub>640</sub> nm. 200 µL da suspensão celular ajustada foi transferida para um microtubo estéril, centrifugada a 12.000 xg por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante foi completamente descartado.

Na sequência, o *pellet* foi ressuspensão em 200 µL de tampão TE [0,5x] e simultaneamente foi adicionado 10 µL de Proteinase K (0,5 mg/mL) e 200 µL de agarose de baixo ponto de fusão 2,2% (preparada em tampão TE 0,5x). Essa suspensão foi adicionada aos poços das moldeiras (aproximadamente 100 µL por poço) e os *plugs* (blocos de agarose) solidificaram à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos. Após solidificação, os *plugs* foram retirados das moldeiras e colocados em um tubo com 5 mL de tampão de lise (5 mL Tris [1M] + 10 mL EDTA [0,5 M] + 20 mL Sarcosyl [5%] + qsp água ultrapura) suplementado com 125 µL de Proteinase K (0,5 mg/mL) durante 4 horas a 55° C. Após retirar a solução de lise, foi adicionado 10 mL de tampão TE [0,5x] (aquecido a 40° C) e mantido na estufa a 37° C sob leve agitação, durante 30 minutos.

Para digestão enzimática, foi incubada uma fina parte do *plug* (aproximadamente 2 mm) em 40 µL de tampão da enzima [1x] durante 1 hora a 37° C, sem agitação. Logo após, foi adicionado ao *plug* outra solução de tampão 1x com 40 U da enzima XbaI (Ludwig Biotec), incubando durante 4 horas a 37° C, sem agitação. Ao término da digestão enzimática do DNA, um bloco de cada amostra foi posicionado nos poços do gel de agarose preparado na concentração de 1% (p/v) em tampão TBE [0,5x]. Nos orifícios localizados nas extremidades do gel foram colocados discos contendo os marcadores de peso molecular *lambda ladder* (New England Biolabs). As canaletas foram seladas com agarose de baixo ponto de fusão preparada a 1% (p/v) em tampão TBE [0,5x].

A eletroforese foi realizada no aparelho CHEF-DR III ® (BioRad), em TBE [0,5x] a temperatura de 12°C na voltagem de 6V/cm durante 21 horas. Os pulsos foram de 5 a 40 segundos com ângulo de 120°. O gel foi corado com 5 µL de brometo de etídio e visualizado usando um transiluminador. Os padrões de banda foram analisados por intermédio da comparação visual entre as amostras e através do programa GelCompar II versão 3.5 (Applied Maths) usando o coeficiente Dice de similaridade e o método de *Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages* (UPGMA) para análise dos agrupamentos e construção dos dendrogramas.

### 3. 9 Avaliação fenotípica da produção de biofilme

Para os ensaios de produção de biofilme as amostras foram selecionadas de acordo com os diferentes perfis no PFGE, bem como o sítio de isolamento (colonização ou infecção). Como controle positivo foi utilizado a amostra *K. pneumoniae* NTUH-K2044 e como controle do ensaio apenas o meio de cultura sem inóculo bacteriano. A pesquisa de biofilme foi realizada de acordo com Merritt; Kadouri e O'Toole (2005), com algumas modificações conforme descrito abaixo. Foram realizados três experimentos independentes para cada amostra.

#### 3. 9. 1 Preparação do inóculo bacteriano

Uma colônia bacteriana de cada amostra teste de *K. pneumoniae* foi suspensa em 20 mL de TSB e incubada a 37°C, durante 18 horas, sob agitação a 120 rpm.

#### 3. 9. 2 Ensaio de adesão à superfície inerte

A suspensão celular obtida pelo crescimento *overnight* ( $\sim 10^9$  células/mL) foi lavada duas vezes em solução salina estéril (20 mL NaCl 0,9%, 7800 rpm, 10 minutos) e diluída para uma concentração celular de aproximadamente  $10^7$  células/mL em TSB. 200  $\mu$ L dessa suspensão de células foi inoculada em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços, em triplicata para cada amostra testada. As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C sob agitação a 120 rpm. Após o período de adesão, os poços foram raspados para remoção das células aderidas (*scrapping*). Diluições seriadas foram realizadas e as suspensões celulares plaqueadas em ágar TSA para enumeração das células.

#### 3. 9. 3 Contagem de células viáveis no biofilme

Foram realizados dois ensaios diferentes para formação de biofilme, um para contagem de células viáveis do biofilme e outro para quantificação de biomassa. A suspensão celular obtida pelo crescimento *overnight* ( $\sim 10^9$  células/mL) foi diluída para uma concentração celular de aproximadamente  $10^7$  células/mL. Para cada amostra, 200  $\mu$ L dessa suspensão de células foi inoculada em triplicata em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços. Após 24 horas de incubação, os poços foram raspados para remoção das células



aderidas (*scrapping*) por 1 minuto e 30 segundos. Diluições seriadas foram realizadas e as suspensões celulares plaqueadas em Agar TSA para enumeração das células.

### 3. 9. 4 Produção de biofilme

Para os ensaios de quantificação de biomassa por cristal violeta, cada amostra bacteriana foi inoculada em 8 poços da placa. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C sob agitação a 120 rpm. Os biofilmes foram lavados duas vezes com solução salina estéril e, em seguida, os poços foram preenchidos com metanol por 15 minutos para fixação do biofilme. Após esse período, o metanol foi descartado e as placas secadas em posição invertida a temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL de uma solução de cristal violeta 1% foram adicionados em cada poço por 5 minutos. Os poços foram lavados vigorosamente com água destilada estéril e secos a temperatura ambiente. 200 µL de ácido acético 33% foram adicionados a cada poço para solubilizar o corante. A microplaca foi incubada por 10 minutos, 100 µL da solução de cristal violeta solubilizado foram transferidos para novas placas e a absorbância avaliada em leitor de placas a 570 nm com ácido acético 33% como branco.

### 3. 9. 5 Classificação do biofilme

Após o experimento de quantificação da biomassa por cristal violeta, as amostras foram classificadas nas categorias de não produtor, produtor fraco, produtor moderado e produtor forte de biofilme, de acordo com os critérios descritos por Saxena e colaboradores (2014) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Critérios para classificação da produção de biofilme.

Valor médio da DO	Produção de Biofilme
$DO_i^1 \leq DO_c^2$	Não produtor
$DO_c < DO_i \leq 2 \times DO_c$	Fraco produtor
$2 \times DO_c < DO_i \leq 4 \times DO_c$	Moderado produtor
$4 \times DO_c < DO_i$	Forte produtor

Valor de *cut-off* da densidade ótica (DO): média da DO controle negativo + 3x desvio padrão; <sup>1</sup>DO<sub>i</sub> do amostra; <sup>2</sup>DO<sub>c</sub> do controle negativo.

### 3. 10 Avaliação fenotípica da hiper mucoviscosidade “*string test*”

A avaliação fenotípica da hiper mucoviscosidade foi realizada pelo *string test* de acordo com os critérios descritos por Catalán-Nájera e colaboradores (2017). As amostras foram cultivadas em placas de ágar TSA e incubadas *overnight* à 37°C. Após o crescimento bacteriano, foi avaliada a formação de um filamento viscoso ao tocar com uma alça estéril a superfície de uma colônia. A formação do filamento  $\geq 5$ mm, caracteriza a cepa como hiper mucoviscosa.

### 3. 11 Sequenciamento e montagem do genoma

O sequenciamento completo do genoma foi realizado para quatro cepas de *K. pneumoniae* resistentes à colistina, selecionadas a partir dos diferentes perfis clonais obtidos através da técnica de PFGE, sendo cada cepa representativa de um clone encontrado. No caso particular do clone A, a amostra KPC40, foi escolhida por ser considerado o caso índice do surto na UTI de adultos.

#### 3. 11. 1 Extração do DNA genômico e sequenciamento

Inicialmente, a extração de DNA das amostras selecionadas foi realizada com o kit comercial PureLink® Genomic DNA mini Kit – Invitrogen (Applied Biosystems by Life Technologies), conforme as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado a partir da plataforma NextSeq 500 (Illumina) utilizando leituras *paired-end* de 150 pb no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP-GENIAL) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil.

#### 3.11. 2 Qualidade e montagem dos dados

Para verificar o controle de qualidade dos dados das sequências brutas obtidas pelo sequenciamento de alto rendimento, foi utilizado o programa FastQC Read Quality reports (Galaxy Version 0.69) (Disponível em: <https://usegalaxy.org>), que tem como funcionalidade plotar gráficos para identificar a qualidade do sequenciamento.

Os arquivos brutos gerados a partir do sequenciamento (*reads*) foram posteriormente submetidos a uma montagem *de novo* (sem o uso de um genoma de referência) utilizando o

programa Geneious R9 e Velvet 5.0.1, gerando sequências contíguas (*contigs*). Os *contigs* foram comparados com dados genômicos do banco de nucleotídeos não redundante do NCBI, a partir do algoritmo megablast do programa BLAST 2.2.28. Além disso, foi possível identificar contaminantes e separar produtos pertencentes ao cromossomo e/ou plasmídeos, baseando-se no melhor *Hit* de BLAST e gerando conjuntos de *contigs*.

Os dados do sequenciamento foram submetidos ao NCBI para anotação dos genomas (*Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*), em que foi possível caracterizar os genes e CDS (totais e codificadores), rRNAs, tRNAs, e pseudo genes. Além disso, tais dados foram depositados no banco de dados de domínio público (NCBI de genomas bacterianos).

### 3. 11. 3 Análises *in silico*

Análises comparativas *in silico* foram realizadas a partir de interfaces da plataforma *Center for Genomic Epidemiology* (<http://genomicepidemiology.org/>) e outras, conforme apresentado a seguir. A confirmação das espécies bacterianas foi obtida analisando-se a sequência do DNA ribossomal 16S, através da ferramenta Species Finder 1.2 (Disponível em: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/SpeciesFinder>). Genes de resistência foram determinados a partir do ResFinder 2.1 (Disponível em: <https://cge.cbs.dtu.dk//services/ResFinder/>). Enquanto que o *Sequece type*, foi acurado utilizando a ferramenta MLST 1.8 (Disponível em: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>), método baseado na amplificação e sequenciamento de fragmentos internos de 7 genes *housekeeping* de *K. pneumoniae*: *rpoB* ( $\beta$ -subunit of RNA polymerase); *gapA* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase); *mdh* (malate dehydrogenase); *pgi* (phosphoglucose isomerase); *phoE* (phosphorine E); *infB* (translation initiation factor 2) e *tonB* (periplasmic energy transducer). Os alelos e STs obtidos em cada amostra avaliada foram comparados com as linhagens disponibilizadas no banco de dados MLST para *K. pneumoniae*, e a construção dos grupos de similaridade entre os STs foi realizada pelo goeBURST (Disponível em: <http://goeburst.phyloviz.net>).

A ferramenta online BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e o programa Geneious, foram usados para identificar importantes genes de virulência presentes no genoma bacteriano. Elementos genéticos móveis e repetições invertidas foram identificadas usando-se a plataforma ISFinder (Disponível em: <https://isfinder.biotoul.fr>), BLASTn e o programa Geneious, no qual a ferramenta *Pairwise Align* possibilitou análise das mutações e a alta cobertura das sequências analisadas como fator de validação. A ferramenta online PROVEAN Protein, (disponível em: <http://provean.jcvi.org/seqsubmit.php>) foi utilizada para avaliar o

impacto das substituições de aminoácidos sobre a função biológica da proteína e a ferramenta online ANIcalculator (disponível em: <https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>) foi utilizada para comparar a similaridade entre as sequências de genoma procarióticos.

### 3.12 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism 5.0<sup>®</sup>. Os ensaios quantitativos foram comparados por meio de análise de variância simples (One way ANOVA) ou pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando como pós-testes os testes de comparação múltipla de Bonferroni ou Dunn's, quando apropriado. Todos os testes foram realizados com intervalo de confiança de 95% e foi considerado significativo quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

No período de setembro de 2014 a setembro de 2016 foi realizada vigilância epidemiológica para o levantamento de todos os casos de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos. Durante essa vigilância, ocorreu um importante surto de *K. pneumoniae* resistente a colistina na UTI de adultos do HC-UFU, nos meses de março a julho de 2015 envolvendo 9 pacientes com 23 isolados. Nesse trabalho, as 23 amostras de *K. pneumoniae* foram selecionadas (12 de infecção e 11 de colonização) para as análises microbiológicas e moleculares recuperadas dos pacientes envolvidos no surto. O organograma representativo de todos os resultados apresentados a seguir está detalhado no APÊNDICE A.

A Tabela 6 mostra os indicadores epidemiológicos e a mortalidade dos pacientes infectados e colonizados por amostras de *K pneumoniae* produtoras de KPC (KP-KPC) resistentes e suscetíveis à colistina na UTI de adultos durante a vigilância epidemiológica de setembro de 2014 a setembro de 2016 e a mortalidade em 30 dias. A incidência geral de infecção e colonização por KP-KPC neste estudo foi de 2,3 e 4,3/1.000 pacientes-dia, respectivamente. A taxa de mortalidade em 30 dias foi de 14,9%. A incidência de KP-KPC resistente à colistina/1.000 pacientes-dia foi alta neste período (0,8/1.000 pacientes-dia). Embora o consumo de antibióticos tenha variado durante o período investigado, com alto uso de todas as classes, o consumo de carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro foi muito superior às demais classes.

**Tabela 6.** Indicadores epidemiológicos, média DDD por 1000 pacientes-dia e frequência da mortalidade em 30 dias dos pacientes com KP-KPC na UTI de setembro de 2014 a setembro de 2016

Variáveis	Valores
Pacientes-dia	22,8
Episódios de KP-KPC <sup>1</sup> /1000 pacientes-dia	7,2
Infecções por KP-KPC/1000 pacientes-dia	2,3
Colonização por KP-KPC por /1000 pacientes-dia	4,3
KP-KPC COL-R <sup>2</sup> /1000 pacientes-dia	0,8
Infecção por KP-KPC COL-R/1000 pacientes-dia	0,3
Colonização por KP-KPC COL-R/1000 pacientes-dia	0,4
DDD <sup>3</sup> Fluorquinolonas <sup>4</sup>	64,2
DDD Polimixinas <sup>5</sup>	158,4
DDD Carbapenêmicos <sup>6</sup>	407,3
DDD Cefalosporinas <sup>7</sup>	508,7
Mortalidade 30 dias	14,9%

<sup>1</sup>KP-KPC, *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC; <sup>2</sup>COL-R, Colistina-resistente; <sup>3</sup>DDD, Dose Diária Definida por 1000 pacientes-dia; <sup>4</sup>Fluorquinolonas, ciprofloxacina e levofloxacina; <sup>5</sup>Polimixinas, polimixina B e colistina; <sup>6</sup>Carbapenêmicos, ertapenem, imipenem e meropenem; <sup>7</sup>Cefalosporinas, ceftriaxone e cefepime.

As características epidemiológicas e os dados demográficos dos pacientes com KP-KPC resistentes à colistina são mostradas na Tabela 7. No total, 77,8% foram do sexo masculino, com média de idade de  $53,22 \pm 15,84$  (22 a 69 anos) e 77,8% dos pacientes permaneceram internados por mais de 30 dias na UTI de adultos. Em relação aos procedimentos invasivos, todos os pacientes estavam em uso de cateter venoso central, prótese respiratória e sonda nasoenteral ou nasogástrica, 88,9% com traqueostomia e 66,7% em nutrição parenteral.

No total, a maioria dos pacientes receberam carbapenêmicos como terapia prévia (77,7%) e 44,4% receberam colistina. Quarenta e quatro por cento dos pacientes estavam colonizados e infectados concomitantemente e três pacientes estavam apenas colonizados. A colistina foi usada no tratamento de dois pacientes infectados (pacientes 2 e 3). No total,

quatro pacientes infectados evoluíram para óbito 30 dias após o diagnóstico (44,4%), três deles com infecções graves. A maioria dos pacientes que recebeu alta estava colonizado por KP-KPC (Tabela 7).

**Tabela 7.** Características clínicas e demográficas de pacientes com infecção e/ou colonização causado por, pelo menos, uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo KPC (KP-KPC) resistente a colistina na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) no período de março de 2015 a julho de 2015

Paciente/ Gênero	Idade (anos)	Diagnóstico <sup>3</sup>	Data de Isolamento	Sítio	Tempo de Hospitalização	Tempo até Diagnóstico	Procedimentos Invasivos <sup>4</sup>	Uso prévio de Antibiótico <sup>5</sup>	Tratamento	Alta/ Óbito		
1/F <sup>1</sup>	47	NE HAS	18/03/2015	Liquor	85	63	CVC, TQT, VM, SNG/E,	CFZ, CPM,VAN, MEM	MEM	Óbito		
			23/03/2015	Sítio Cirúrgico		68	NP, DRE, HEM	COL	MEM			
			25/03/2015	Mucosa Retal		70			-			
			06/04/2015	Liquor		82			VAN, AMK, MEM			
2/M <sup>2</sup>	69	DC HIV HBV	04/05/2015	Pulmão	66	25	CVC, TQT, VM, SNG/E,	TEC, CLI, CRO, CIP, CPM,	MEM, TEC TIG, COL	Óbito		
			26/05/2015	Mucosa Retal		47	NP, DRE, HEM	PTZ, SUT, MEM, TIG,	-			
			27/05/2015	Pulmão		48		COL	-			
			02/06/2015	Pulmão		54			-			
3/M	63	HI	20/06/2015	Urina	62	44	CVC, VM, SNG/E, HEM	PTZ, TEC, MEM, COL TIG, LVX, IPM	TIG, COL, IMP	Óbito		
			26/06/2015	Pulmão					50		TIG, COL, IMP, LVX	
			25/06/2015	Pulmão					49		TIG, COL, IMP, LVX	
4/M	67	TC	25/06/2015	Ponta de Cateter	34	22	CVC, TQT, VM, SNG/E	CFZ, CPM, VAN, TEC	TIG, MEM, AMK, COL	Óbito		
			02/07/2015	Mucosa Retal					29		HEM	-
5/M	58	PTz	13/07/2015	Pulmão	58	5	CVC, TQT, VM, SNG/E,	TEC, MEM	ERT, AMK, MER	Alta		
			14/07/2015	Mucosa Retal					6		NP, HEM	-
			28/07/2015	Mucosa Retal					20			-
6/M	52	FC	14/07/2015	Urina	58	50	CVC, TQT, VM, SNG/E, NP, DRE,	CFZ, CPM, IMP, COL, VAN	AMK	Alta		
7/F	36	TC	15/07/2015	Mucosa Retal	33	5	CVC, TQT, VM, SNG/E	CFZ		Alta		
			28/07/2015	Mucosa Retal					18			
8/M	22	FAF	15/07/2015	Mucosa Retal	22	19	CVC, TQT, VM, SNG/E, NP	CFZ, CFP, VAN, MEM	-	Alta		
9/M	65	TEP	21/07/2015	Mucosa Retal	25	12	CVC, TQT, VM, SNG/E,	PTZ	-	Alta		
			28/07/2015	Mucosa Retal					19		NP	-

<sup>1</sup>F, Gênero feminino; <sup>2</sup>M, Gênero masculino; NE, <sup>3</sup>Neoplasia; HAS, Hipertensão Arterial Sistêmica; DC, Doença de Chagas; HIV, Vírus da Imunodeficiência Humana; HBV, Vírus da Hepatite B; HI, Hérnia inguinal; TC, Traumatismo craniano; PTz, Politrauma; FC, Fratura cervical; FAF, Ferimento por arma de fogo; TEP, Tromboembolismo pulmonar; <sup>4</sup>CVC, Cateter venoso central; TQT, Traqueostomia; VM, Ventilação mecânica; SNG/E, Sonda nasogástrica/nasoenteral; NP, Nutrição parenteral; DRE, Dreno; HEM, Hemodiálise; <sup>5</sup>CFZ, Cefazolina; CPM, Cefepime; VAN, Vancomicina; MEM, Meropenem; COL, Colistina; TEC, Teicoplanina; CLI, Clindamicina; CRO, Ceftriaxone; CIP, Ciprofloxacina; PTZ, Piperacilina-tazobactam; TIG, Tigeciclina; LVX, Levofloxacina; IMP, Imipenem; AMK, Amicacina; ERT, Ertapenem; -, Antibioticoterapia ausente.

As características microbiológicas, genes de resistência aos carbapenêmicos e o perfil clonal das amostras resistentes à colistina são mostrados na Tabela 8. Todas as amostras incluídas neste estudo carregaram o gene *bla*<sub>KPC</sub>, exceto a cepa 121KP. Nenhuma das cepas apresentaram os genes *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>VIM</sub>. A resistência a colistina foi confirmada pela microdiluição em caldo e apenas a amostra de infecção do paciente 2 (60KPC) foi sensível a colistina (MIC < 2 µg/ml). Entre os pacientes infectados, quatro foram colonizados por cepas do mesmo perfil clonal da cepa que causou a infecção (pacientes 1, 2, 4 e 5). Os pacientes que estavam apenas colonizados apresentaram amostras do mesmo perfil clonal A (pacientes 7, 8 e 9), exceto uma cepa recuperada no paciente 7 que foi caracterizada como clone D. Entre os pacientes infectados, o clone A foi o mais frequente (75,0%) e três pacientes tiveram infecção previamente a colonização (33,3%). A coexistência de mais de um clone envolvido na colonização e ou infecção do mesmo paciente ao mesmo tempo também foi observado em frequências importantes (44,4%).

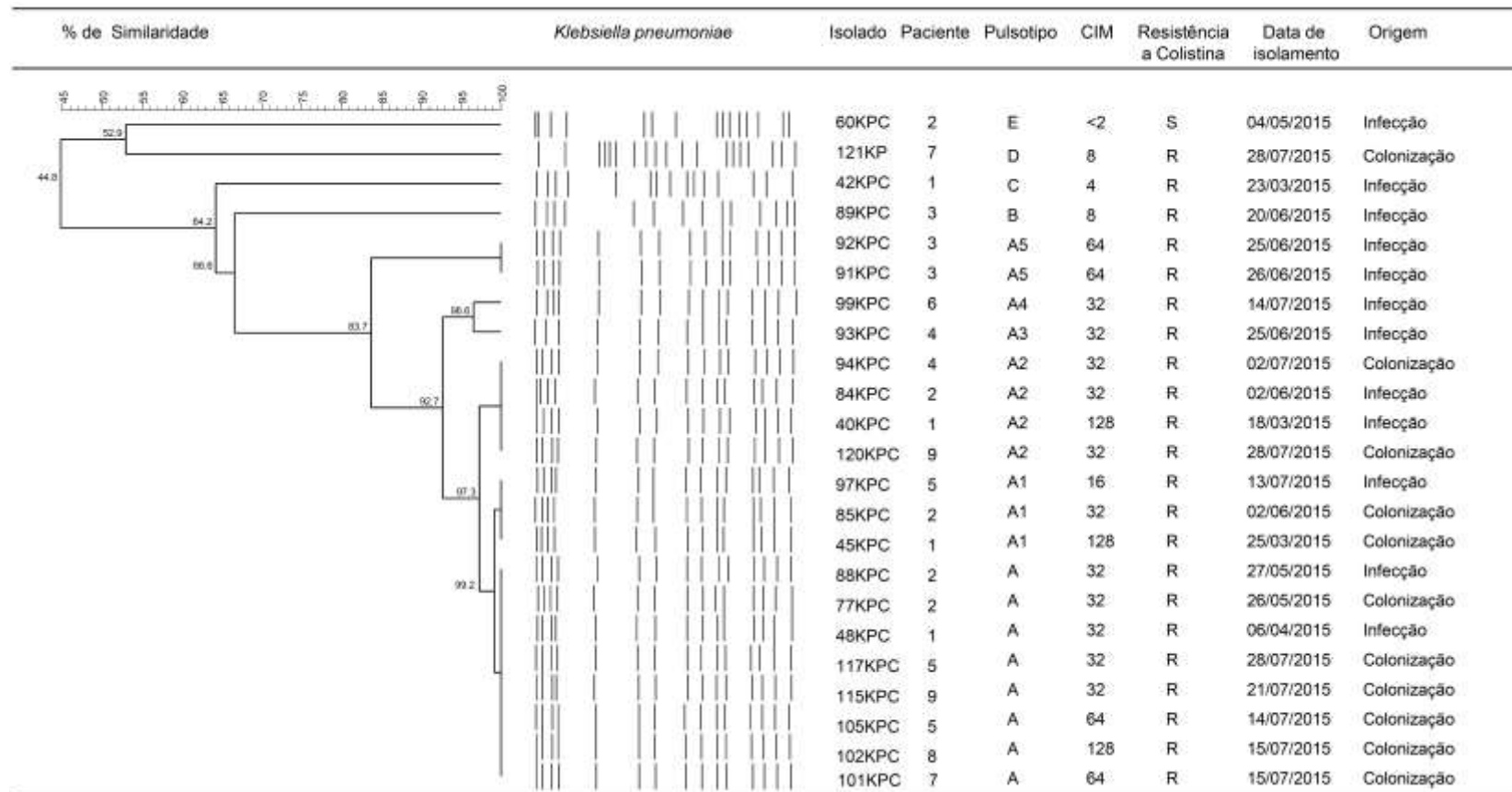


**Tabela 8.** Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para colistina, caracterização molecular dos determinantes de resistência aos carbapenêmicos e perfil clonal das amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase do tipo KPC (KP-KPC) na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) no período de março a julho de 2015

Paciente	Amostra	Data de Isolamento	Origem	CIM <sup>1</sup> (µg/ml)	Resistência a Colistina	Gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Gene <i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Gene <i>bla</i> <sub>IMP</sub>	Gene <i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Perfil de PFGE <sup>4</sup>
1	40KPC	18/03/2015	Liquor	128	Col-R <sup>2</sup>	+	-	-	-	A2
	42KPC	23/03/2015	Sítio Cirúrgico	4	Col-R	+	-	-	-	C
	45KPC	25/03/2015	Mucosa Retal	128	Col-R	+	-	-	-	A1
	48KPC	06/04/2015	Liquor	32	Col-R	+	-	-	-	A
2	60KPC	04/05/2015	Pulmão	< 2	Col-S <sup>3</sup>	+	-	-	-	E
	77KPC	26/05/2015	Mucosa Retal	32	Col-R	+	-	-	-	A
	88KPC	27/05/2015	Pulmão	32	Col-R	+	-	-	-	A
	84KPC	02/06/2015	Pulmão	32	Col-R	+	-	-	-	A2
	85KPC	02/06/2015	Mucosa Retal	32	Col-R	+	-	-	-	A1
3	89KPC	20/06/2015	Urina	8	Col-R	+	-	-	-	B
	91KPC	26/06/2015	Pulmão	64	Col-R	+	-	-	-	A5
	92KPC	25/06/2015	Pulmão	64	Col-R	+	-	-	-	A5
4	93KPC	25/06/2015	Ponta de Cateter	32	Col-R	+	-	-	-	A3
	94KPC	02/07/2015	Mucosa Retal	32	Col-R	+	-	-	-	A2
5	97KPC	13/07/2015	Pulmão	16	Col-R	+	-	-	-	A1
	105KPC	14/07/2015	Mucosa Retal	64	Col-R	+	-	-	-	A
	117KPC	28/07/2015	Mucosa Retal	32	Col-R	+	-	-	-	A
6	99KPC	14/07/2015	Urina	32	Col-R	+	-	-	-	A4
7	101KPC	15/07/2015	Mucosa Retal	64	Col-R	+	-	-	-	A
	121KP	28/07/2015	Mucosa Retal	8	Col-R	-	-	-	-	D
8	102KPC	15/07/2015	Mucosa Retal	128	Col-R	+	-	-	-	A
9	115KPC	21/07/2015	Mucosa Retal	32	Col-R	+	-	-	-	A
	120KPC	28/07/2015	Mucosa Retal	32	Col-R	+	-	-	-	A2

<sup>1</sup>Concentração Inibitória Mínima; <sup>2</sup>Col-R, resistente a colistina; <sup>3</sup>Col-S, sensível a colistina; <sup>4</sup>*Pulsed Field Gel Electrophoresis*; (+) positivo para o gene avaliado; (-) negativo para o gene avaliado.

No total, foram identificados cinco padrões de perfis clonais a partir da técnica de PFGE (A-E). Entre as 23 amostras analisadas, o clone A foi o mais frequente (86,6%) e foi classificado em 6 subtipos (A1-A5) (Figura 2). Houve evidente transmissão cruzada do pulsotipo A na unidade com a detecção do mesmo clone em pacientes diferentes. As cepas pertencentes ao clone A apresentaram valores de concentrações inibitórias mínimas (CIMs) maiores do que os apresentados pelos outros clones e não houve diferenças nos valores de CIM entre as amostras de infecção e colonização.



**Figura 2.** Dendrograma gerado por análise computadorizada de perfis clonais de DNA de 23 amostras clínicas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase do tipo KPC (KP-KPC) resistentes a colistina baseado na eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). A análise foi realizada pelo método de Dice/UPGMA (similaridade  $\geq 80\%$ ). CIM, concentração inibitória mínima; S, sensível; R, resistente.

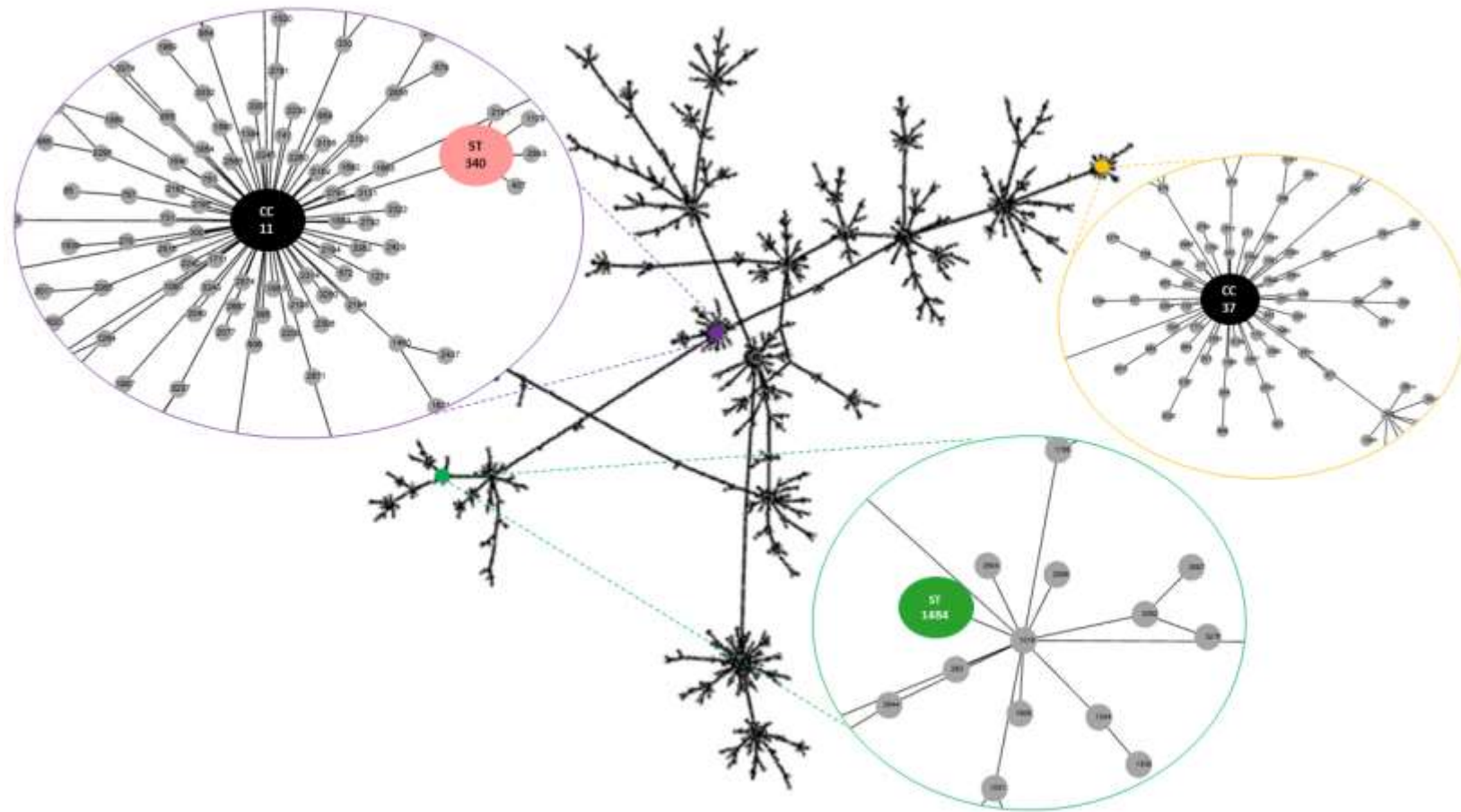
De acordo com os resultados dos perfis clonais obtidos através da técnica de PFGE, foram selecionadas para o Sequenciamento Completo do Genoma uma amostra representativa de cada clone de *K. pneumoniae* resistente a colistina, sendo que a amostra KPC40 pertencente ao clone A, foi escolhida por ser considerada o caso índice do surto na UTI de adultos.

A Tabela 9 mostra os números de acesso das cepas publicados no NCBI e os dados gerados a partir do sequenciamento. O genoma do cromossomo pertencente às cepas 40KPC, 42KPC, 89KPC e 121KP tiveram um tamanho de 5,366MB, 5,370MB, 5,868 MB e 5,774MB, respectivamente. A análise revelou que as amostras foram classificadas em diferentes STs, ST11, ST37, ST340 e ST1484. A partir da análise dos alelos foi construída a figura 2, que mostra a população *snapshot* dos STs de *K. pneumoniae* descritos até o momento, evidenciando a similaridade entre eles e a indicação daqueles detectados neste estudo, bem como de seus respectivos complexos clonais (Figura 3).

**Tabela 9.** Características do genoma das cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a colistina pertencentes aos diferentes perfis clonais e número de acesso no Genbank

Cepa	Origem	Perfil de PFGE <sup>1</sup>	ST <sup>2</sup>	CIM <sup>3</sup> (µg/ml) COL <sup>4</sup>	Características do Genoma			
					Tamanho do Genoma (Mb)	Genes Codificados	Genes codificadores de RNA	Número de Acesso Genbank
40KPC	Liquor	A2	11	128	5,366	5,108	53	NIRG01000000
42KPC	Sítio Cirúrgico	C	37	4	5,370	5,165	53	QODD01000000
89KPC	Urina	B	340	8	5,868	5,632	53	QXGQ01000000
121KP	Mucosa Retal	D	1484	8	5,774	5,549	44	QXXP00000000

<sup>1</sup>Pulsed Field Gel Electrophoresis; <sup>2</sup>Sequence Type; <sup>3</sup>Concentração Inibitória Mínima; <sup>4</sup>Colistina



**Figura 3.** Diagrama construído utilizando o algoritmo goeBURST e visualizado no software PhyloViz (PHYLOVIZ Online) indicando a similaridade entre os *Sequence Types* (STs). Os Complexos Clonais (CCs) e os STs observados no presente estudo estão ampliados e destacados por cores.

A amostra 121KP foi inicialmente identificada como *K. pneumoniae* no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU pelo sistema Vitek-2® (bioMérieux, Brasil). Após o sequenciamento do genoma houve a confirmação de que se tratava de uma cepa de *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*. A identificação foi confirmada com base em dois critérios: (i) a cepa apresentou uma identidade média de nucleotídeos de 98,98% com a estirpe de referência da mesma subespécie KP142 (CP023478.1) através de uma ferramenta online que compara a similaridade entre as sequências de genoma procarióticos (ANICalculator, disponível em: <https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>); e (ii) a presença do gene *bla*<sub>OKP-B</sub>. A cepa foi identificada como sendo do grupo KPIIb corroborando a classificação da subespécie (Tabela 10).

**Tabela 10.** Identidade média de nucleotídeos do genoma de *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (KP121) comparada a outros genomas de diferentes espécies de *Klebsiella*

Genomas <i>Klebsiella</i> spp.	Tamanho (nucleotídeos)	DNA (G+C) <sup>1</sup> (%)	ANI <sup>2</sup> KP121 x genomas
<i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i> UCICRE (KI535451)	5.263.297	58.16	96.71%
<i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> KP142 (CP023478)	5.217.300	57.85	98.98 %
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> KPC42 (NZ_QODD000000000)	5.315.950	57.37	93.90%
<i>K. variicola</i> at-22 (NC_013850)	5.458.505	57.58	93.60

<sup>1</sup>Porcentagem do conteúdo de bases pareadas do tipo G-C; <sup>2</sup>Average nucleotide identity

As amostras sequenciadas apresentaram uma quantidade expressiva de genes de resistência, a maioria deles relacionados à resistência a fluorquinolonas, sendo os genes *oqxA* e *oqxB* os mais frequentes. A cepa de *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (121KP) apresentou mais genes de resistência aos aminoglicosídeos que as demais cepas. Observou-se que as amostras pertencentes aos STs 11 e 340 apresentaram maior quantidade de genes de resistência e somente elas apresentaram o gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> e *bla*<sub>SHV-11</sub>. A amostra 121KP, do clone D e ST1484, foi a única que apresentou o gene *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (Tabela 11).

**Tabela 11.** Genes de resistência as diferentes classes de antimicrobianos nas cepas de *K. pneumoniae* e *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* resistentes a colistina

Classes	Gene	Cepas			
		Clone A ST11 40KPC	Clone C ST37 42KPC	Clone B ST340 89KPC	Clone D ST 1484 121KP
<b>A<sup>1</sup></b>	<i>aac(6')Ib-cr</i>	+	-	-	-
	<i>aph(3')-Ia</i>	+	-	-	+
	<i>aph(3)-IId</i>	-	-	+	-
	<i>ant(2'')-Ia</i>	-	-	-	+
	<i>aadA2</i>	-	-	-	+
	<i>aadA1</i>	-	-	+	-
<b>B<sup>2</sup></b>	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	+	+	+	-
	<i>bla<sub>SHV-1</sub></i>	-	+	-	-
	<i>bla<sub>SHV-11</sub></i>	+	-	+	-
	<i>bla<sub>CTXM-9</sub></i>	-	-	-	+
	<i>bla<sub>CTXM-15</sub></i>	+	-	+	-
	<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	+	-	-	-
	<i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>	-	-	+	-
	<i>bla<sub>LEN12</sub></i>	-	-	+	-
<b>F<sup>3</sup></b>	<i>bla<sub>OKP-B-2</sub></i>	-	-	-	+
	<i>qnrA1</i>	-	-	-	+
	<i>qnrB19</i>	+	-	-	-
	<i>qnrE</i>	-	-	+	-
	<i>qnrS1</i>	-	+	-	-
	<i>oqxA</i>	+	+	+	+
<b>Fo<sup>4</sup></b>	<i>oqxB</i>	+	+	+	+
	<i>FosA</i>	+	+	+	+
<b>MLS<sup>5</sup></b>	<i>mph(A)</i>	+	-	-	-
<b>P<sup>6</sup></b>	<i>catA2</i>	-	-	+	+
	<i>catB3</i>	+	-	-	-
<b>R<sup>7</sup></b>	<i>ARR-3</i>	+	-	-	-
<b>S<sup>8</sup></b>	<i>sulI</i>	+	+	-	+
<b>Te<sup>9</sup></b>	<i>tet(D)</i>	-	+	+	-
	<i>tet(D)</i>	-	-	+	+
<b>Tr<sup>10</sup></b>	<i>dfrA14</i>	-	-	+	-
	<i>dfrA22</i>	-	+	-	-

<sup>1</sup>Aminoglicosídeos; <sup>2</sup> $\beta$ -lactâmicos; <sup>3</sup>Fluorquinolonas; <sup>4</sup>Fosfomicina; <sup>5</sup>Macrolídeos, lincosamidas, streptograminas; <sup>6</sup>Fenicol; <sup>7</sup>Rifampicina; <sup>8</sup>Sulfonamidas; <sup>9</sup>Tetraciclina; <sup>10</sup>Trimetropima; (+) positivo para o gene avaliado; (-) negativo para o gene avaliado.

A presença de mutações nos genes *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ*, *crrA*, *crrB* e *mgrB* relacionadas a resistência a colistina também foi avaliada nessas amostras. A amostra 40KPC,

89KPC e 42KPC pertencentes aos clones A, B e C, respectivamente, apresentaram as mesmas mutações nos genes *pmrB* (R256G) e *phoQ* (D146G). Além disso, a amostra do clone C, também apresentou uma troca no gene *crrB* (I27V). A cepa KP121 caracterizada como *K. quasipneumoniae subsp. similipneumoniae* teve o maior número de mutações: *pmrB* (S363I), *phoQ* (L424P) e *crrB* (Q99R; Q239H; Q287K; L295K) (Tabela 12).

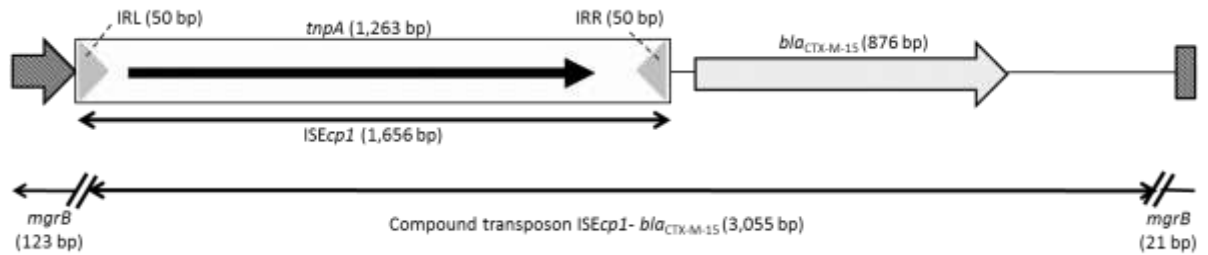
Na cepa 40KPC que apresentou valor de CIM elevado (128 µg/ml) foi identificado um fragmento de 3.055 pb inserido no gene *mgrB*. Essa inserção aconteceu entre os nucleotídeos +21 e +22 e o fragmento inserido foi caracterizado como um transposon contendo a sequência de inserção *ISEcpI* e o gene *bla<sub>CTX-M-15</sub>* (*ISEcpI-bla<sub>CTX-M-15</sub>*). Este elemento de inserção é formado por uma região *tnpA* de 1.263 pb que codifica uma transposase flanqueada por duas sequências repetidas e invertidas: IRR e IRL, ( do inglês *right inverted repeats* e *left inverted repeats*) cada uma com 50 pb. A figura 4 mostra a representação esquemática do gene *mgrB* truncado pela sequência de inserção *ISEcpI*(1656 pb) associada ao gene *bla<sub>CTX-M-15</sub>* (876 pb).

**Tabela 12.** Resultados cumulativos de várias mutações nos genes *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ*, *crrA*, *crrB* e alterações no gene *mgrB* nas cepas de *Klebsiella* sp. resistentes à colistina

Cepa	Perfil de PFGE <sup>1</sup>	ST <sup>2</sup>	CIM <sup>3</sup> (µg/ml)	Alterações de Aminoácidos						
				<i>pmrA</i>	<i>pmrB</i>	<i>phoP</i>	<i>phoQ</i>	<i>crrA</i>	<i>crrB</i>	<i>mgrB</i>
40KPC	A2	11	128	-	R256G	-	D146G	-	-	<i>ISEcpI-bla<sub>CTX-M-15</sub></i>
42KPC	C	37	4	-	R256G	-	D146G	-	I27V	-
89KPC	B	340	8	-	R256G	-	D146G	-	-	-
121KP	D	1484	8	-	S363I	-	L424P	-	Q99R; Q239H; Q287K; L295K	-

<sup>1</sup>Pulsed Field Gel Electrophoresis; <sup>2</sup>Sequence Type; <sup>3</sup>Concentração Inibitória Mínima; (-) não houve alterações no gene; R, Arginina; G, Glicina; S, Serina; I, Isoleucina; D, Aspartato; L, Leucina; P, Prolina; V, Valina; Q, Glutamina; H, Histidina; K, Lisina.





**Figura 4.** Representação esquemática do gene *mgrB* truncado pela sequência de inserção ISEcp1 juntamente com o gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> na amostra KPC40. As setas indicam os genes e suas respectivas orientações de transcrição. IRL e IRR, do inglês *left inverted repeats* e *right inverted repeats*. O truncamento do gene *mgrB* é representado por traços diagonais. *tnpA* corresponde ao gene codificador da transposase da ISEcp1.

Do total de 23 amostras testadas pela PCR para amplificação do gene *mgrB*, as cepas do clone A apresentaram um amplicon de aproximadamente 3000 pb ao contrário das amostras pertencentes aos demais clones que tiveram um amplicon de 144 pares de base, o que condiz com o tamanho do gene *mgrB* sem alterações. As amostras com alterações no gene *mgrB* apresentaram MICs para colistina bem mais elevados quando comparadas com as demais. Vale ressaltar que todas as amostras do clone A que tem essa alteração albergaram o gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, a única exceção foi a amostra 102KPC, dados demonstrados na tabela 13.

**Tabela 13.** Concentração inibitória mínima (CIM) para colistina, tamanho do gene *mgrB* e presença do gene *bla*<sub>CTX-M</sub> nas cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a colistina

Cepa	CIM <sup>1</sup> (µg/ml)	Perfil de PFGE <sup>2</sup>	Tamanho do gene <i>mgrB</i> /pb	Gene <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>
40KPC	128	A2	≈ 3000	+
42KPC	4	C	144	-
45KPC	128	A1	≈3000	+
48KPC	32	A	≈3000	+
60KPC	< 2	E	144	-
77KPC	32	A	≈3000	+
84KPC	32	A2	NA <sup>3</sup>	-
85KPC	32	A1	≈3000	+
88KPC	32	A	≈3000	+
89KPC	8	B	144	+
91KPC	64	A5	≈3000	+
92KPC	64	A5	≈3000	+
93KPC	32	A3	NA	-
94KPC	32	A2	≈3000	+
97KPC	16	A1	≈3000	+
99KPC	32	A4	NA	-
101KPC	64	A	≈3000	+
102KPC	128	A	144	-
105KPC	64	A	≈3000	+
115KPC	32	A	≈3000	+
117KPC	32	A	NA	-
120KPC	32	A2	≈3000	+
121KP	8	D	144	+

<sup>1</sup>Concentração Inibitória Mínima; <sup>2</sup>Pulsed Field Gel Electrophoresis; (+) positivo para o gene avaliado; (-) negativo para o gene avaliado; <sup>3</sup>Não amplificado; ≈ aproximadamente.

Todas as amostras foram testadas por PCR para os genes de virulência: *fimA*, *fimH*, *wabG*, *iucC*, *rmpA*, *ecpA*, *khe*, *entB*, *Kfu*, *ybtS*, *allS*, *mrkD* e *iutA*. A tabela 14 mostra a frequência desses genes discriminados por origem e pulsotipo e a classificação de acordo com o perfil de virulência apresentado por cada cepa. Foram identificados 5 perfis de virulência (V1-V5) e o perfil de virulência V1 (*fimA*, *fimH*, *wabG*, *entB*, *ybtS*) foi o mais frequente, sendo observado em 69,6% das amostras. Interessantemente, a maioria das amostras pertencentes ao clone A, apresentaram perfil de virulência V1, exceto a cepa 48KPC que foi

caracterizada no perfil V2 (*fimA*, *fimH*, *entB*, *ybtS*) e a amostra 102KPC que juntamente com duas cepas dos clones B e C apresentaram o perfil V4 (*fimA*, *fimH*, *wabG*, *entB*). Somente a amostra clone E foi classificada como perfil de virulência V3 (*fimH*, *wabG*, *entB*, *ybtS*). Apenas a amostra 84KPC, pertencente ao clone A, não apresentou nenhum dos genes de virulência avaliados.

A cepa 121KP de *K. quasipneumoniae subsp. similipneumoniae* apresentou perfil com mais genes de virulência (V5) e apesar de ser resistente aos carbapenêmicos não foi positiva para o gene *bla*<sub>KPC</sub>. Além disso, a cepa 121KP foi a única positiva quanto a avaliação fenotípica da hipermucoviscosidade (*string test*).

Observou-se que o clone A foi caracterizado principalmente pela presença do gene de virulência *ybtS* e todos os outros clones apresentaram perfis de virulência diferentes do perfil apresentado pelas cepas do clone A. Do total de amostras 95,6% apresentaram o gene *bla*<sub>KPC</sub>, exceto a cepa 121KP e 65,2% apresentaram o gene *bla*<sub>CTX-M</sub> (Tabela 14).

**Tabela 14.** Caracterização molecular e perfil de virulência dos 23 isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a colistina

Cepa	Origem	Perfil de PFGE <sup>1</sup>	Genes de resistência	Genes de virulência	Perfil de virulência
			<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, iucC, rmpA, ecpA, khe, entB, Kfu, ybtS, allS, iutA, mrkD</i>	(V1-V5)
40KPC	I	A2	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB, ybtS</i>	V1
42KPC	I	C	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB</i>	V4
45KPC	C	A1	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB, ybtS</i>	V1
48KPC	I	A	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, entB, ybtS</i>	V2
60KPC	I	E	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimH, wabG, entB, ybtS</i>	V3
77KPC	C	A	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB, ybtS</i>	V1
84KPC	I	A2	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	-	-
85KPC	C	A1	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB, ybtS</i>	V1
88KPC	I	A	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB, ybtS</i>	V1
89KPC	I	B	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB</i>	V4
91KPC	I	A5	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB, ybtS</i>	V1
92KPC	I	A5	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB, ybtS</i>	V1
93KPC	I	A3	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB, ybtS</i>	V1
94KPC	C	A2	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB, ybtS</i>	V1
97KPC	I	A1	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB, ybtS</i>	V1
99KPC	I	A4	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB, ybtS</i>	V1
101KPC	C	A	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB, ybtS</i>	V1
102KPC	C	A	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB</i>	V4
105KPC	C	A	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB, ybtS</i>	V1
115KPC	C	A	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB, ybtS</i>	V1
117KPC	C	A	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB, ybtS</i>	V1
120KPC	C	A2	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>fimA, fimH, wabG, entB, ybtS</i>	V1
121KP	C	D	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>ecpA, fimA, fimH, wabG, entB, kfu, allS</i>	V5

<sup>1</sup> Pulsed Field Gel Electrophoresis

Os genes *iutA* e *mrkD* foram testados para todas as amostras por PCR, porém não amplificaram. A confirmação da presença dos genes de virulência foi realizada para as quatro

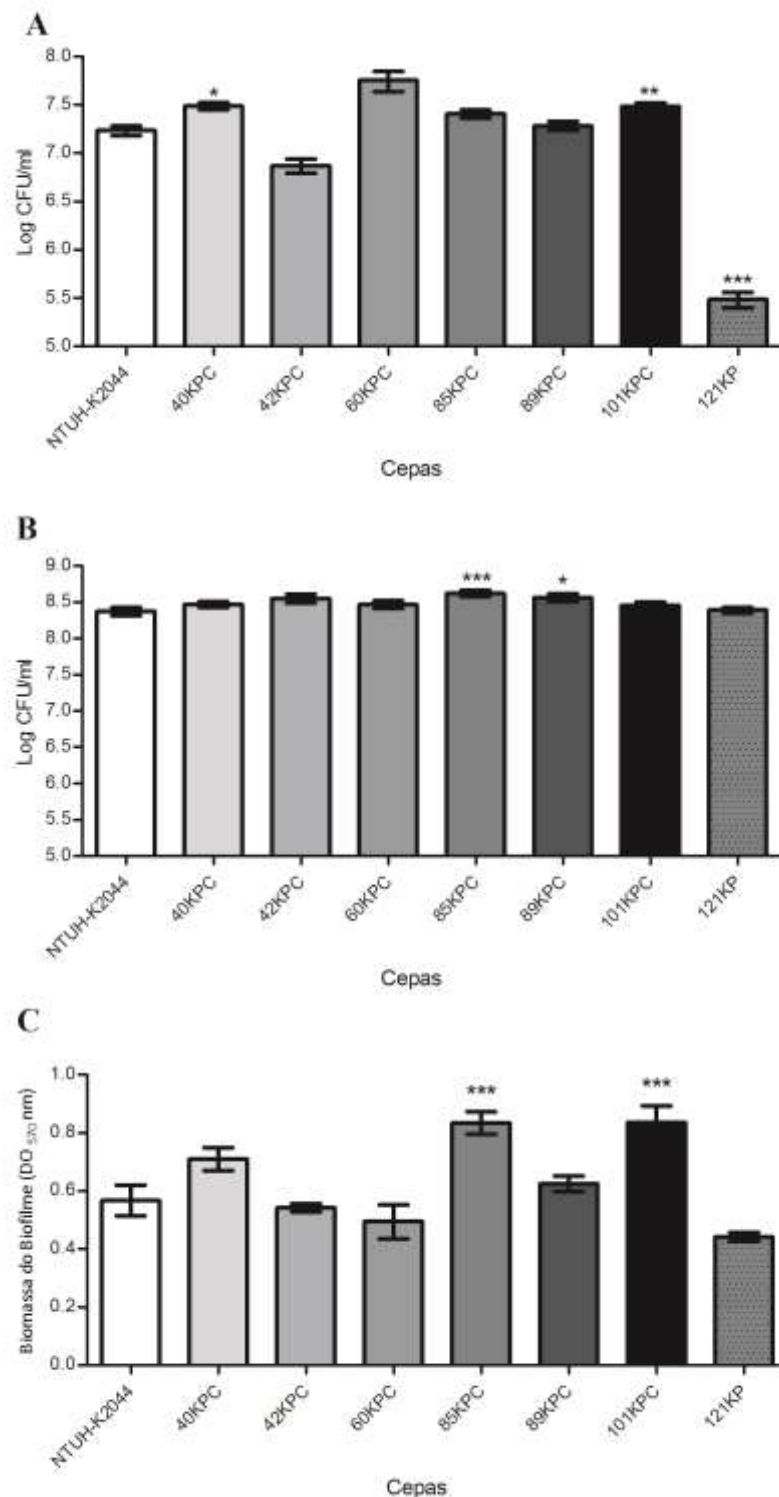
cepas que tiveram seus genomas sequenciados, todas as cepas sequenciadas continham os genes *iutA* e *mrkD*. O sequenciamento do genoma confirmou a presença dos demais genes detectados por PCR (Tabela 15).

**Tabela 15.** Perfil de virulência dos quatro isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a colistina sequenciados

Cepa	Origem	ST <sup>1</sup>	Genes de Virulência											
			<i>fim</i> cluster <sup>2</sup>	<i>mrK</i> cluster <sup>3</sup>	<i>all</i> ABCDRS	<i>mrkD</i>	<i>ecpA</i>	<i>wabG</i>	<i>ureAE</i>	<i>ugE</i>	<i>entB</i>	<i>iutA</i>	<i>traT</i>	<i>kfuABC</i>
40KPC	Liquor	11	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
42KPC	Sítio Cirúrgico	37	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
89KPC	Urina	340	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
121KP	Mucosa Retal	1484	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

<sup>1</sup>Sequence Type; <sup>2</sup>*fim* cluster: *fim*ABCDEFGHIK; <sup>3</sup>*mrK* cluster: *mrK*ABCDEFHJ; os genes *iucABC*, *ecpBC*, *rmpAB*, *iroBCDN*, *irp1/2* e *pdl1* não foram encontrados.

Na avaliação da formação de biofilme, foram testadas amostras dos diferentes clones encontrados a partir do PFGE e sítios de isolamento (infecção e colonização). Todas as cepas estudadas foram capazes de aderir às placas de poliestireno, entretanto, estatisticamente, as amostras 40KPC e 101KPC aderiram melhor enquanto que a cepa 121KP aderiu pouco quando comparadas ao controle positivo *K. pneumoniae* NTUH-K2044 (Figura 5A). Em relação ao número de células presentes no biofilme, as amostras 85KPC e 89KPC mostraram maior número de células viáveis, e não houve diferença significativa na formação de biofilme entre os isolados de infecção e colonização (Figura 5B). A produção de biofilme também foi avaliada pela determinação da biomassa do biofilme, medida por densidade óptica a 570 nm, utilizando a metodologia com o corante cristal violeta, e a média da densidade óptica de controle das amostras foi 0,267 ( $\pm 0,04$ ). As amostras 85KPC e 101KPC produziram mais biomassa de biofilme que o controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 5C).



**Figura 5.** Avaliação do número de células aderidas, formação de biofilme e biomassa em sete amostras de *K. pneumoniae*. a) Número de células aderidas a uma superfície de poliestireno após 2 horas de adesão, expressas como Log UFC/ml; b) Concentração celular do biofilme expresso como Log UFC/ml; c) Biomassa do biofilme expressa como densidade óptica do cristal violeta (DO<sub>570nm</sub>). Resultados representam médias com desvio padrão (barras de erro) de três experimentos independentes. \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ , usando Kruskal-Wallis, Teste de comparação múltipla de Dunn. *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 foi utilizada como controle.

A produção do biofilme, avaliada pelo método quantitativo, revelou que 85,7% das amostras foram classificadas como produtoras moderadas de biofilme e apenas uma cepa foi classificada como fraca produtora (121KP). Não foi encontrada relação entre o sítio de isolamento (colonização ou infecção) bem como a resistência a colistina e a habilidade de formar biofilme (Tabela 16).

**Tabela 16.** Classificação da formação de biofilme bacteriano pelo método de microtitulação em placa nas cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae*

Cepas	D.O <sup>1</sup>	Produção de Biofilme	Resistência <sup>2</sup>	Perfil de PFGE <sup>3</sup>	Origem
<i>K pneumoniae</i> NTUH-K2044 (controle positivo)	0,57	Moderado	--	--	--
40KPC	0,71	Moderado	Col-R	A2	Liquor
42KPC	0,54	Moderado	Col-R	C	Sítio Cirúrgico
60KPC	0,49	Moderado	Col-S	E	Trato respiratório
85KPC	0,83	Moderado	Col-R	A1	Mucosa Retal
89KPC	0,62	Moderado	Col-R	B	Urina
101KPC	0,84	Moderado	Col-R	A	Mucosa Retal
121KP	0,44	Fraco	Col-R	D	Mucosa Retal

<sup>1</sup>Densidade ótica (570 nm) = média da D.O. do controle negativo + 3x o desvio padrão do controle negativo; <sup>2</sup>Col-R, resistente a colistina; Col-S, sensível a colistina; <sup>3</sup>*Pulsed Field Gel Electrophoresis*.

## 5. DISCUSSÃO

Entre os microrganismos cuja multirresistência aos antimicrobianos tem sido motivo de grande preocupação está a *Klebsiella pneumoniae*, particularmente aquelas que produzem carbapenemases e estão associadas às IRAS (KANG et al., 2005; GALES et al., 2012; TANWAR et al., 2014; GIACOBBE et al., 2015; GONÇALVES et al., 2016). Esse destaque para *K. pneumoniae* se dá principalmente pela facilidade de transferência horizontal de genes de resistência através de elementos genéticos móveis, que são considerados mecanismos de resistência comumente encontrados em Bacilos Gram-negativos da Família Enterobacteriaceae (GOOTZ, 2010; TANWAR et al., 2014; HOU et al., 2015; KATHRYN et

al., 2015). No Brasil, esse problema fica ainda mais evidente, considerando que a emergência e disseminação desses fenótipos capazes de se estabelecer no ambiente hospitalar, estão relacionadas com o uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos. Vale ressaltar que em países de baixa e média renda como o Brasil, a prescrição de determinados antimicrobianos é muito maior do que em países da Europa e América do Norte (MEYER et al., 2003; MOREIRA et al., 2013; PORTO et al., 2013; DANTAS et al., 2014; DANTAS et al., 2017).

Podemos exemplificar esse alto uso de antimicrobianos com os antibióticos carbapenêmicos, que passaram a ser frequentemente usados no tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* que apresentam resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, através da produção de  $\beta$ -lactamases de amplo espectro. Com o aumento do uso de carbapenêmicos, surgiram as cepas resistentes, principalmente pela emergência de enzimas como as carbapenemases, com destaque para a KPC (CHEN; ANDERSON; PATERSON, 2012; LEE et al., 2016; GONÇALVES et al., 2017). Desde que essa enzima foi encontrada pela primeira vez em uma amostra clínica de *K. pneumoniae* na Carolina do Norte (EUA) em 1996 (YIGIT et al., 2001), disseminou-se pelo mundo todo (BEIRÃO et al., 2011; CASTANHEIRA et al., 2013; RUIZ-GARBAJOSA et al., 2013; LEE et al., 2016; VAN DUIN; DOI, 2017).

No Brasil, muitas publicações têm documentando a rápida disseminação e endemicidade de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase do tipo KPC (KP-KPC) em todas as regiões do país, muitas vezes associadas com surtos de IRAS (MONTEIRO et al., 2009; PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009; PEIRANO et al., 2009; GALES et al., 2012; PEREIRA et al., 2013; GONÇALVES et al., 2016). Vale ressaltar também que, além da KPC, outras carbapenemases têm assumido importância epidemiológica, devido a sua associação com transposons, plasmídeos e integrons. Entre elas, o destaque é dado para as metalo- $\beta$ -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).

Nossos dados confirmaram a disseminação do gene *bla*<sub>KPC</sub> que foi identificado em todos as linhagens de *K. pneumoniae* resistentes a colistina estudados, entretanto, o gene *bla*<sub>NDM</sub> bem como os genes *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>VIM</sub> não foram identificados. Embora relatos que evidenciam a presença concomitante desses genes em uma mesma cepa ainda sejam raros na literatura (YANG et al., 2018; LIU et al., 2019), é importante ressaltar que o contexto na qual essas



amostras foram recuperadas permite inferir que é possível, em um curto prazo, que esse fenômeno possa ser relatado mais frequentemente, considerando que o ambiente é favorável, confirmado através de relatos da alta densidade de uso de antimicrobianos principalmente  $\beta$ -lactâmicos e carbapenêmicos, a endemicidade de cepas de *P. aeruginosa* apresentando esses genes, bem como a emergência de microrganismos carreando o gene *bla<sub>NDM</sub>* no hospital (MOREIRA et al., 2013; PORTO et al., 2013; DANTAS et al., 2014; DANTAS et al., 2017 GONÇALVES et al., 2018).

Dados preocupantes sobre a incidência do fenótipo KP-KPC, bem como do consumo de antimicrobianos, foi demonstrado durante o período avaliado nesse trabalho, no qual altas taxas de incidência de infecções e colonizações por KP-KPC (2,3 e 4,3/1.000 pacientes-dia, respectivamente) e de KP-KPC resistente à colistina/1.000 pacientes-dia (0,8/1.000 pacientes-dia) foram observadas. Em relação ao consumo de antibióticos, foi observado um alto consumo de antibióticos de amplo espectro, principalmente de cefalosporinas, seguido de carbapenêmicos e polimixinas. Apesar de algumas limitações quanto às avaliações de DDD, o estudo evidenciou dados preocupantes de resistência a polimixina nas cepas resistentes aos carbapenêmicos.

A colistina (polimixina E) é frequentemente utilizada como opção terapêutica para o tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (CANNATELLI, et al; 2014; LEE et al., 2016). Entretanto, seu uso intenso e indiscriminado resultou na disseminação de resistência à colistina em *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases, particularmente do tipo KPC em muitos países, fazendo com que essa prevalência crescente se torne uma ameaça a saúde pública (BOGDANOVICH et al., 2011; CANNATELLI et al., 2014; MONACO et al., 2014; GIACOBBE et al., 2015). A importância do uso de colistina foi evidenciada em um estudo multicêntrico realizado nos hospitais na Itália, mostrando que a taxa de resistência à colistina entre as amostras de KP-KPC aumentou mais de três vezes durante o período de investigação, e a mortalidade em 30 dias foi de aproximadamente 51% (GIACOBBE et al., 2015).

No Brasil, os dados também são preocupantes, por exemplo, em São Paulo, no ano de 2015, pesquisadores descreveram taxa de 35,5% de KP-KPC causando infecções, e um aumento na resistência à colistina nessas cepas de 0% em 2011 para 27,1% em 2015 (BARTOLLETTI et al., 2016), Braun e colaboradores (2018) também relataram aumento da resistência a colistina de 0% para 30,6% no período de sete anos de estudo. O aumento progressivo da resistência à colistina também foi relatado em outras cidades do Brasil (LORENZONI et al., 2018; FERREIRA et al., 2018a; RODRIGUES et al., 2019). Um surto

importante de infecções por KP-KPC resistente a colistina foi relatado no HC-UFU, em que foi confirmada a transmissão cruzada da bactéria entre os pacientes, não só pela relação espacial como também pela clonalidade entre as linhagens, evidenciando problemas em relação à higienização das mãos na Unidade (GONÇALVES et al., 2016).

Em se tratando de clonalidade, os resultados deste estudo, revelam a presença de múltiplos genótipos de KP-KPC resistentes a colistina causando infecção ou colonização em um mesmo paciente, o que pode ser o resultado da adaptação genética da cepa para o hospedeiro humano, bem como para o ambiente hospitalar. Há evidências que a colonização prévia está associada com infecção subsequente em uma mesma população, especialmente em pacientes hospitalizados (SHET et al., 2009; HESS et al., 2014; MARTIN et al., 2016). Embora não tenhamos avaliado a importância da pressão de colonização para o desenvolvimento de infecções subsequentes, alguns estudos, como o de Rocha e colaboradores (2013) e Campos e colaboradores (2014) realizados no mesmo hospital, em pacientes infectados com cepas de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium*, respectivamente, demonstraram uma pressão de colonização prévia elevada, que pode estar relacionada com o desenvolvimento de infecções graves por esses microrganismos.

Além disso, bactérias como a KP-KPC, que são capazes de persistir *in vivo* frente a forte pressão seletiva exercida pela presença de antimicrobianos, sofrem variações dentro da própria linhagem, tornando-se mais aptas a sobreviver no ambiente hospitalar (DAVIES; DAVIES, 2010; NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017; LI et al., 2017). Os resultados deste estudo revelam que, entre os pacientes colonizados e infectados, a maioria das infecções por KP-KPC resistentes à colistina foram causadas por cepas geneticamente idênticas das cepas relacionadas à colonização. Observamos também que aproximadamente 50% das infecções recorrentes foram causadas por cepas do mesmo clone que causou infecções anteriormente.

Esses resultados sugerem que as infecções causadas por cepas de KP-KPC resistentes a colistina neste estudo, são causadas por uma recidiva de infecção anterior. Essa observação é semelhante ao estudo de Chen e colaboradores (2010), em que observaram que infecções repetidas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) foram causadas por cepas idênticas, sugerindo que a maioria das infecções estava associada a uma recidiva da infecção inicial. Assim, nosso estudo fornece evidências da associação entre a colonização e o desenvolvimento subsequente de infecções nesses pacientes. Múltiplos isolados no mesmo paciente podem estar relacionados à propagação de diferentes elementos genéticos contendo

genes de resistência, bem como a proximidade de pacientes colonizados com cepas (iguais ou de diferentes clones), além da facilidade de transmissão via mãos dos profissionais de saúde.

Avaliações e estudos da relação entre as cepas como este aqui apresentado, envolvendo clonalidade, são possíveis pela disponibilidade de técnicas que permitam avaliar a sua similaridade genética. A técnica de PFGE tem a capacidade de identificar perfis clonais, e com isso se tornou essencial na detecção de surtos e identificação de cepas endêmicas, permitindo o acesso a dados que podem auxiliar na implementação de medidas mais adequadas na prevenção e controle de infecções (BLANC, 2004; GOERING, 2010; NSOFOR, 2016). A importância dessa técnica foi evidenciada no nosso estudo, no qual foi determinado um perfil policlonal de disseminação das amostras de KP-KPC resistentes a colistina, embora houvesse o forte predomínio do estabelecimento do clone A na unidade. Observou-se que as amostras pertencentes a esse clone estão associadas a fenótipos extremamente resistentes, sugerindo uma possível expansão desse clone na unidade com capacidade de tornar-se endêmico, bem como evidências da transmissão cruzada entre os pacientes. Essas amostras apresentam vários outros genes de resistência e virulência, o que sugere que esses elementos podem favorecer a permanência desses clones no ambiente hospitalar.

A literatura tem mostrado que a disseminação do fenótipo KP-KPC, tem sido identificada em todo o mundo e está evidenciado que essa disseminação pode ser causada pela presença de clones de alto risco, principalmente aqueles pertencentes ao CC 258, que incluem principalmente os *sequence types* ST258, ST11, ST340, ST437 e ST512 (ANDRADE et al., 2011; BOGDANOVICH et al., 2011; WOODFORD et al., 2011; MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015; LIANG et al., 2017). No Brasil, o destaque é a disseminação do ST11, que é endêmico também em outros países da Ásia e Europa (ANDRADE et al., 2011; QI et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; LEE et al., 2016). Neste estudo, entre as quatro cepas que tiveram seus genomas sequenciados, as análises do *sequence type* revelaram que as amostras foram classificadas em diferentes STs: ST11, ST37, ST340 e ST1484. Apesar de não termos analisado todas as linhagens, ficou evidente através do estudo da clonalidade e caracterização molecular das cepas, que provavelmente a maioria delas pertencentes ao clone A, são também pertencentes ao ST11. Assim como hipotetizado por Liu e colaboradores (2018), as cepas de KP-KPC caracterizadas como do ST11, possuem uma grande capacidade de adquirir genes de resistência e conservá-los, o que pode contribuir para a permanência dessas cepas no ambiente hospitalar, onde há uma alta pressão seletiva causada pelo uso constante de antimicrobianos (LIU et al., 2018).

Além do ST11, podemos ressaltar também a importância da emergência de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos pertencentes aos ST37 e ST340 (LI et al., 2017; TOLENTINO et al., 2018; MONTEIRO et al., 2019). Esses clones também foram observados neste estudo, evidenciando que esses STs também podem estar associados com resistência a colistina, podendo se tornar endêmicos nas cepas com essas características.

Estudar os mecanismos de resistência em amostras de KP-KPC é de grande importância, principalmente por se tratar de cepas pertencentes a STs classificados como clones internacionais de alto risco, que são endêmicos no Brasil, e resistentes a colistina. Embora a resistência a colistina em *K. pneumoniae* esteja frequentemente associada a mutações em vários genes cromossômicos como *mgrB*, *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB* e *crrAB* (CHENG et al., 2015; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017; MELETIS; SKOURA, 2018), relatos recentes chamam atenção para um mecanismo de resistência adicional, que foi a identificação do gene *mcr-1* codificado por plasmídeo (LIU et al., 2016). Esse gene foi descrito pela primeira vez por Liu e colaboradores na China, no ano de 2015, em cepas de *K. pneumoniae* e *E. coli* com potencial de espalhar rapidamente entre diferentes bactérias (LIU et al., 2016). Esse potencial foi confirmado, uma vez que, depois desse primeiro relato, novas variantes do gene *mcr-1* foram identificadas nos cinco continentes, confirmando sua capacidade de transmissão e a evolução contínua da resistência a colistina (DI PILATO et al., 2016; FERNANDES et al., 2016; AL-TAWFIQ; LAXMINARAYAN; MENDELSON, 2017; YANG et al., 2017; SUN et al., 2018).

Felizmente, esse gene não foi encontrado nas linhagens analisadas, entretanto, foi identificada uma importante alteração no gene *mgrB* que justificou o alto nível de resistência à colistina encontrado na cepa 40KPC, representativa do clone dominante A. O fragmento de 3.055 pares de base inserido no gene *mgrB*, foi identificado como um transposon composto pela sequência de inserção *ISEcp1* e o gene *bla<sub>CTX-M-15</sub>*. Este estudo mostra que a inserção do gene *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, juntamente com o elemento de inserção *ISEcp1* no gene cromossomal *mgrB*, resultou em resistência adquirida concomitantemente as cefalosporinas de amplo espectro e também a colistina, e foi considerado o principal mecanismo de resistência a colistina. Para o nosso conhecimento, esse mecanismo não foi descrito no Brasil até o momento, e há somente um único estudo realizado na França, no ano de 2016, que relatou a identificação desse evento genético que levou a resistência a colistina, também em uma cepa de *K. pneumoniae* (JAYOL et al., 2016).

Interessantemente, no nosso estudo, analisando amplicons resultantes da PCR realizadas para cepas resistentes a colistina que não foram sequenciadas, nós observamos que

fragmentos do gene *mgrB* tinham aproximadamente 3000 pares de base visualizados a partir do gel de eletroforese. Embora nem todas as cepas tenham sido sequenciadas, essa observação reforça a percepção de que o gene *mgrB* contém elementos adicionais relacionados a ele, e para o nosso entendimento, há uma grande probabilidade que seja o elemento de inserção (*ISEcp1*), juntamente com o gene *bla<sub>CTX-M-15</sub>*. Entretanto, mais estudos de sequenciamento genômico devem ser realizados para que essa hipótese seja confirmada.

Esses resultados indicam que os genes de resistência às cefalosporinas de amplo espectro, podem estar associados à resistência à colistina em *K. pneumoniae* no ambiente hospitalar, fornecendo evidências de que a inserção do gene *bla<sub>CTX-M-15</sub>* juntamente com o elemento *ISEcp1* no gene *mgrB* em uma linhagem altamente resistente recuperada de um ambiente com alto uso de antibióticos, levou à resistência à colistina. Além dessa importante alteração no gene *mgrB*, outras mutações foram encontradas nos genes *pmrB*, *phoQ* e *crrB* (R256G; D146G e I27V), entretanto, com o uso de uma ferramenta online que avalia se uma substituição de aminoácidos tem um impacto sobre a função biológica de uma proteína (PROVEAN Protein, disponível em: <http://provean.jcvi.org/seqsubmit.php>), revelou que tais alterações podem não estar relacionadas com resistência a colistina.

Como mencionado anteriormente, o ambiente no qual essas cepas foram recuperadas, contribuem para que as bactérias possam desenvolver diferentes mecanismos de resistência. Entre eles, o destaque é dado para cepas produtoras de ESBLs em *K. pneumoniae*, principalmente *bla<sub>CTX-M</sub>*. 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<sub>CTX-M-15</sub>*), CTXM-2 (ex., *bla<sub>CTX-M-2</sub>*), CTX-M-8 (ex., *bla<sub>CTX-M-8</sub>*), CTX-M-9 (ex., *bla<sub>CTX-M-14</sub>*) 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;PINTO;BARBOSA, 2016) e estima-se que aproximadamente 50% das amostras de *K. pneumoniae* sejam produtoras de ESBL (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016), aumentando o risco de falhas terapêuticas e mortalidade nos pacientes.

Nas cepas que apresentam os genes que codificam as ESBLs, a literatura tem mostrado, particularmente naquelas que contém o gene *bla<sub>CTX-M</sub>*, sua associação frequente com a sequência de inserção *ISEcp1*, que contribui para a sua disseminação e expressão em membros da família Enterobacteriaceae (POIREL et al., 2006). A estreita associação evolutiva do gene *bla<sub>CTX-M</sub>* e a sequência de inserção *ISEcp1* é bem conhecida e amplamente demonstrada (POIREL et al., 2005; DHANJI et al., 2011; SINGH; SINGHAL; VIRDI, 2018),

entretanto a associação desses elementos inseridos no gene *mgrB* em cepas de KP-KPC, resultando na resistência a colistina, são raros (JAYOL et al., 2016; FERREIRA et al., 2018b).

Embora a resistência aos antimicrobianos esteja associada com a mortalidade dos pacientes com infecções graves causadas por *K. pneumoniae* (KANG et al., 2005; GALES et al., 2012; TANWAR et al., 2014), vários estudos tem demonstrado também que a capacidade dessas cepas de causar infecções está associada a presença de vários fatores de virulência, incluindo a produção de biofilmes, que pode favorecer a sua adaptação no ambiente hospitalar bem como nos diversos hospedeiros (CHUNG, 2016; FERREIRA et al., 2018a; KHAERTYNOV et al., 2018).

A maioria das amostras clínicas de *Klebsiella* spp. produz uma cápsula polissacarídica extracelular, podendo determinar a partir dessas cápsulas, sorotipos e intensidades de virulência (BRISSE et al., 2009; COMPAIN et al., 2014; PACZOSA; MECSAS, 2016). O gene *rmpA*, regulador da síntese de exopolissacarídeos é responsável pelo fenótipo mucóide e invasivo de algumas amostras (LI et al., 2014). Neste estudo, embora as amostras de KP-KPC não tenham apresentado o gene *rmpA*, as cepas que tiveram seus genomas sequenciados confirmaram a presença do gene de aerobactina (*iutA*), sugerindo a presença de genótipos altamente virulentos na população estudada. Interessantemente, todos os pacientes com esse fenótipo causando infecção evoluíram para o óbito, portanto as cepas altamente virulentas tem um papel significativo na mortalidade desses pacientes, uma vez que, aqueles que estavam somente colonizados não evoluíram para óbito.

Outro aspecto importante é a adesão da bactéria nas superfícies mucosas do hospedeiro, uma etapa essencial para o desenvolvimento da infecção. Geralmente, em bactérias Gram negativas, essa adesão é mediada pelas fímbrias do tipo 1 e/ou tipo 3 (NUNES, 2009; STAHLHUT et al., 2009; ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013) e 95,6% das amostras clínicas do estudo codificaram para essas adesinas. A literatura mostra ainda que as adesinas do tipo 3 codificadas pelo gene *mrkD* promovem adesão da bactéria na ausência de manose auxiliando na formação de biofilmes (JAGNOW; CLEGG, 2003). No nosso estudo, assim como no gene *iutA*, o sequenciamento do genoma confirmou a presença desse gene nas amostras, que foi corroborado fenotipicamente pela produção de biofilmes nas amostras analisadas.

Outro fator a ser considerado quanto a *K. pneumoniae* é a capacidade de apresentar sideróforos, que apresentam afinidade para o ferro, garantindo seu fornecimento (MIETHKE, MARAHIEL, 2007; BRISSE et al., 2009; LI et al., 2014). Os genes associados a sideróforos,

tais como *entB*, *ybtS* e *iutA* são amplamente disseminados entre cepas de *K. pneumoniae* (COMPAIN et al., 2014), embora o gene *entB* leva a virulência somente em associação com os genes *iutA*, *ybtS* ou *kfu* (DAEHRE et al., 2018). De acordo com estudos anteriores, que mostram alta frequência do gene *entB* (LAVIGNE et al., 2013; FU et al., 2018), no nosso estudo, todas as cepas de *K. pneumoniae* carregavam o gene *entB* concomitante com o gene *ybtS* ou, com *iutA* ou *kfu*. Outro gene avaliado neste trabalho foi o *wabG*, envolvido na síntese de lipopolissacarídeos, encontrado com alta frequência (91,3%) entre as amostras avaliadas, de acordo com resultados anteriormente publicados (CANDAN, AKSOZ, 2015; BARATI et al., 2016).

Aliado a importantes fatores como a presença de múltiplos elementos que conferem resistência e determinantes de virulência, a capacidade de formar biofilme, pode contribuir ainda mais para a emergência e a disseminação desses fenótipos no ambiente hospitalar. A habilidade de *K. pneumoniae* formar biofilme, protege a bactéria das respostas imunes do hospedeiro, bem como dos antibióticos, aumentando sua persistência nos tecidos epiteliais e superfícies de dispositivos invasivos (VUOTTO et al., 2014; MISHA et al., 2015; CHUNG, 2016; VUOTTO et al., 2017).

Nesse estudo, apesar do pequeno número de amostras (N=7), todos os clones encontrados foram representados para a análise da produção de biofilme, e a capacidade estatística foi corrigida pelo número de réplicas realizado para cada cepa. Sendo assim, para análise de adesão, quantificação das células viáveis e produção de biofilme os testes fenotípicos foram realizados em triplicatas em três experimentos independentes. A análise estatística foi baseada nas repetições dos experimentos, o que caracteriza o uso de uma metodologia laboriosa no estudo de biofilmes. Vale ressaltar que poucos estudos na literatura utilizam essa metodologia, e que a maioria dos trabalhos avaliam a produção de biofilmes somente através de experimentos utilizando cristal violeta e/ou vermelho congo, sem avaliar a concentração de células do biofilme bem como a sua adesão (SANCHEZ et al., 2013; MISHA et al., 2015; IYAMBA., 2016; VUOTTO., 2017).

Na nossa investigação, utilizando caldo TSB sem suplementação, sob as condições experimentais avaliadas, 85,7% das cepas apresentaram moderada produção de biofilme, o que pode ter sido influenciado pelas condições utilizadas. Embora as condições *in vivo* dependam consideravelmente das condições do crescimento bacteriano, das características da cepa, da capacidade de adesão e desenvolvimento do biofilme, entre outros fatores, os nossos resultados podem refletir condições experimentais que não foram utilizadas e que implicam

quantitativamente na produção de biofilme nas cepas de *K. pneumoniae* e que na presença de outros fatores a produção de biofilme poderia ser alterada positivamente ou negativamente.

Apesar disso, alguns estudos corroboram os nossos resultados em que mostram relação entre a produção de biofilme e cepas de *K. pneumoniae* que produzem enzimas associadas à resistência, como presença de ESBL e KPC (CAMPOS et al., 2016; SHAH et al., 2017; FU et al., 2018). Embora não tenhamos encontrado uma relação entre a resistência a colistina, o sítio de isolamento e a produção de biofilme, consideramos que os resultados aqui demonstrados são muito importantes, uma vez que estas características (produção de biofilme, produção de KPC e resistência à colistina) se sobrepõem para produzir um fenótipo difícil de ser erradicado.

A alta ocorrência de KP-KPC é considerada um problema de saúde global (CASTANHEIRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2013; KATHRYN et al., 2015; LIU et al., 2018; TOLENTINO et al., 2018) embora a presença e a transmissão deste microrganismo sejam mais frequentemente documentadas em UTIs (GONÇALVES et al., 2016; XU; SUN; MA, 2017; BRAGA et al., 2018; SALMANOV et al., 2019), todos os cuidados de saúde também são afetados, isso implica que as abordagens relacionadas à prevenção e controle desse patógeno, bem como daqueles multirresistentes, devem ser adaptadas às necessidades específicas de cada instituição. No Brasil, considerando suas dimensões continentais, com macro e micro diferenças regionais em relação aos hospitais, problemas relacionados à diminuição dos recursos disponíveis e alta frequência de resistência bacteriana, principalmente nos hospitais de atenção terciária, resulta em um problema cada vez mais significativo e um desafio no tratamento dos pacientes (LA FORGIA; COUTTOLENC; WASHINGTON, 2008; BRAGA et al., 2018). Aliado a isso, a antibioticoterapia nesses hospitais é usado excessivamente de forma pouco criteriosa, e a ausência de laboratório de microbiologia favorece a prescrição incorreta desses medicamentos, resultando em um pior prognóstico para o paciente (BRAGA et al., 2018). A falta de um laboratório nacional de referência também é outra barreira para a compreensão desses microrganismos, bem como da epidemiologia das infecções, o que leva a uma pobre documentação científica.

Essas lacunas na literatura envolvem, entre outros aspectos, o desafio no reconhecimento de novos reservatórios de genes de resistência e virulência associados a microrganismos epidemiologicamente importantes. Um dos exemplos é a descrição da *K. quasipneumoniae* subsp *similipneumoniae*. Embora haja relatos desse microrganismo desde a definição desta espécie em 2014, esse microrganismo parece ser disseminado (GAN et al., 2017; LONG et al., 2017; SHANKAR et al., 2017; NICOLAS et al., 2018), entretanto, sua identificação não pode ser realizada com técnicas empregadas atualmente nos laboratórios de



microbiologia clínica e sim com técnicas mais complexas como o sequenciamento completo do genoma (LONG et al., 2017; NICOLAS et al., 2018). Assim, sua verdadeira prevalência e capacidade de adquirir genes de resistência aos antimicrobianos ainda permanece desconhecida (LONG et al., 2017).

Nesse estudo, a espécie *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* foi identificada após o sequenciamento do genoma completo, e a descrição de uma subespécie intimamente relacionada a *K. pneumoniae*, que apresentou características como perfil altamente virulento, hipermucoviscosidade e resistência a colistina é significativo, pois pode ser outro importante reservatório de genes de resistência.

Apesar de esta cepa ser resistente à colistina, nenhuma das mutações clássicas responsáveis por esse fenômeno foram detectadas. No entanto, outras mutações ainda não descritas na literatura foram identificadas (S363I em *pmrB*, L424P em *phoQ*, Q99R; Q239H; Q287; L295K em *crrB*). Embora não tenhamos realizado experimentos que confirmem a relação dessas novas mutações com a resistência à colistina, é possível que estas alterações estejam relacionadas a esse fenótipo. Corroborando a importância da emergência dessa cepa no Brasil, foi descrita na região sudeste, uma cepa suscetível a colistina apresentando o gene *bla<sub>KPC</sub>*, o que reforça a idéia de que cepas dessa subespécie podem ser importantes reservatórios de genes de resistência (NICOLAS et al., 2018). Além da resistência, nós encontramos a presença de vários genes de virulência, alguns dos quais foram identificados nas cepas de KP-KPC sequenciadas. Entretanto, os genes que codificam *pilus* comum de *E. coli* (*ecpA*), (*kfu*) e genes associados ao metabolismo de alantoína (*allABCDRS*), foram encontrados somente nessa subespécie. Além disso, essa cepa foi a única caracterizada como hipermucoviscosa através do teste fenotípico realizado.

A circulação recente de novos genes de resistência e as características dos hospitais proporcionam um nicho ecológico favorável para os microrganismos emergirem, principalmente os multirresistentes (FERNANDES et al., 2016; LIU et al., 2016; GONÇALVES et al., 2018; WANG et al., 2018). A literatura demonstra que *K. quasipneumoniae* foi inicialmente descrita como uma subespécie restrita ao meio ambiente (BRISSE et al., 2014), no entanto, relatos recentes mostram que essa subespécie pode ser encontrada também em seres humanos, podendo ainda abrigar genes de resistência clinicamente relevantes (BRISSE et al., 2014; LONG et al., 2017; NICOLAS et al., 2018; FERREIRA et al., 2019; MATHERS et al., 2019). A cepa descrita nesse trabalho foi recuperada de uma colonização, o que é preocupante pelo fato de que, nesse caso, o paciente não costuma receber tratamento. Isolar uma cepa com essas características, resistente a

colistina e um perfil altamente virulento, reforça o fato de que essa subespécie pode estar servindo como um importante reservatório desses genes para outros microrganismos ainda mais virulentos e resistentes. Como mencionado, dadas às dificuldades de identificar com precisão essa espécie, em termos epidemiológicos, não sabemos a real frequência dessas cepas, portanto, esta espécie pode ser mais significativa no contexto da disseminação de genes de resistência do que previamente conhecido.

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).

## **6. CONCLUSÕES**

Os resultados desse estudo permitem compreender melhor a epidemiologia e os aspectos moleculares de linhagens clonais de KP-KPC resistentes a colistina, envolvidas em um importante surto ocorrido no HC-UFU. Utilizando-se de abordagens genômicas, aspectos relacionados ao resistoma e viruloma dessas cepas puderam ser melhores esclarecidos, assim como o mecanismo que deu origem a resistência a colistina nessas cepas. Embora o estudo molecular tenha utilizado um número pequeno de amostras, foi possível elucidar aspectos importantes relacionados com a multirresistência, resistência a colistina e virulência. Adicionalmente, os resultados obtidos permitiram as seguintes considerações:

- O estudo evidenciou dados preocupantes quanto ao consumo de antibióticos, principalmente de cefalosporinas de amplo espectro, carbapenêmicos e polimixinas e esse fato pode ter sido relacionado com a emergência de cepas de KP-KPC resistentes a colistina, ressaltando a importância da pressão seletiva dos antibióticos no ambiente hospitalar;
- Embora tenhamos observado a presença de múltiplos genótipos de KP-KPC resistentes a colistina, causando infecção ou colonização em um mesmo paciente, algumas das infecções foram recorrentes, causadas pela mesma cepa que estava colonizando ou infectando o paciente;

- Observou-se a presença de diferentes clones e houve predomínio do estabelecimento das cepas de KP-KPC resistentes a colistina do clone A. Essas amostras estão associadas a fenótipos extremamente resistentes, sugerindo que esse clone pode se tornar endêmico na unidade;
- As análises do *sequence type* revelaram diferentes STs: ST11, ST37, ST340 e ST1484 e embora não tenhamos analisado todas as linhagens, uma cepa representativa de cada clone foi sequenciada. A cepa 40KPC, representativa do clone dominante A (82,6%) foi caracterizada como do ST11. Como as cepas do clone A tiveram características idênticas, sugerimos que provavelmente as demais também pertençam a esse mesmo ST;
- Foi identificado pela primeira vez no país, um fragmento de 3.055 pares de base inserido no gene *mgrB* composto pela sequência de inserção ISEcp1 e o gene *bla<sub>CTX-M-15</sub>* na cepa 40KPC, representativa do clone dominante A, o que resultou em resistência adquirida concomitantemente as cefalosporinas de amplo espectro e a colistina;
- As amostras 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, comprometendo ainda mais o tratamento dos pacientes;
- As investigações desse estudo confirmam achados prévios em relação à capacidade de formação de biofilme de amostras clínicas de *K. pneumoniae*. As cepas foram produtoras de biofilme, independentemente da resistência a colistina, perfil clonal e o sítio de isolamento, essa característica contribui aumentando a persistência da cepa e dificultando a sua erradicação.
- Foi identificada após o sequenciamento do genoma a espécie *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *Similipneumoniae*, caracterizada como altamente virulenta, hiper mucoviscosa e resistente a colistina, podendo ser um importante reservatório de genes de resistência.

Os aspectos apresentados tornam *K. pneumoniae* um patógeno bem-sucedido em causar infecções, resultando na sua rápida expansão e persistência em ambientes hospitalares. Neste contexto, todo conhecimento apresentando aqui é relevante, e se tornam 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 no Brasil, bem como resistentes a colistina, de modo mais eficaz.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUOUN, M. et al. *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 10, p. 2904, 2018.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dky272>
- ADAMS, M.D. et al. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3628-3634, 2009.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00284-09>
- AIRES, C. A. et al. *MgrB* Mutations mediating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal Surveillance Swabs in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6969-72, 2016.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.01456-16>
- ALCÁNTAR-CURIEL, M. D. et al. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 129-138, 2013.  
<https://doi.org/10.4161/viru.22974>
- AL-TAWFIQ, J. A.; LAXMINARAYAN, R.; MENDELSON, M. et al. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 54, p. 77–84, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.415>
- 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, 2011.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.01783-10>
- ARAUJO, B.F. et al. Hypervirulence and biofilm production in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 523-528, 2018.  
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.000711>
- ARDUINO, S.M. et al. Transposons and integrons in colistin-resistant clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* with epidemic or sporadic behaviour. **Journal of medical microbiology**, v.61, n.10, p.1417-1420, 2012.  
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.038968-0>
- BARATI, A. et al. Isolation and Characterization of Aquatic-Borne *Klebsiella pneumoniae* from Tropical Estuaries in Malaysia. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 426, p. 1-16, 2016.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph13040426>

- BARROW, K.; KWON, D.H. Alterations in two-component regulatory systems of *phoPQ* and *pmrAB* are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5150-5154, 2009.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00893-09>
- BARTOLLETTI, F. et al. PolymyxinB resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, Sao Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 10, p. 1849-1851, 2016.  
<https://doi.org/10.3201/eid2210.160695>
- 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, 2011.  
<https://doi.org/10.1590/S1413-86702011000100013>
- BERTONCHELI, C.M.; HÖRNER, R. A review on metallo- $\beta$ -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 577-599, 2008.  
<https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000400005>
- BEVAN, E. R.; JONES, A. M.; HAWKEY, P. M. Global epidemiology of CTX-M  $\beta$ -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 1, p. 2145-2155, 2017.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkx146>
- BISWAS, S. et al. Colistin: an update on the antibiotic of the 21<sup>st</sup> century. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 8, p. 917-934, 2012.  
<https://doi.org/10.1586/eri.12.78>
- BLANC, D. The use of molecular typing for epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, n. 3, p. 193-197, 2004.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.01.010>
- BOGDANOVICH, T. et al. Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 4, p. 373-376, 2011.  
<https://doi.org/10.1093/cid/cir401>
- BONURA, C. et al. An Update of the Evolving Epidemic of *bla*<sub>KPC</sub> Carrying *Klebsiella pneumoniae* in Sicily, Italy, 2014: Emergence of Multiple Non-ST258 Clones. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0132936, 2015  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132936>
- BOROWIAK, M. et al. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi B*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 12, p. 3317-3324, 2017.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkx327>

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**, v. 99, n. 3, p. 318-324, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.03.003>

BRAUN, G. et al. Temporal evolution of polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones recovered from blood cultures in a teaching hospital during a 7-year period.

**International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 3, p. 522-527, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.08.031>

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, 2009.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004982>

BRISSE, S.; PASSET, V.; GRIMONT, P. A. D. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp.

*similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3146–3152, 2014.

<https://doi.org/10.1099/ijs.0.062737-0>

BRISSE, S.; VERHOEF, J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 915-924, 2001.

<https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-915>

CAMPOS, P. A. et al. A sustained endemic outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: A 30-month surveillance study. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 46, n. 8, p. 547-54, 2014.

<https://doi.org/10.3109/00365548.2014.912348>

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

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

CANDAN, E. D.; AKSOZ, N. *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 4, p. 867-874, 2015.

[https://doi.org/10.18388/abp.2015\\_1148](https://doi.org/10.18388/abp.2015_1148)

CANNATELLI, A. et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, n. 10, p. 5696–5703, 2014.

<https://doi.org/10.1128/AAC.03110-14>

CARROLL, L. M. et al. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. **MBio**, v. 10, n. 3, p. e00853-19, 2019.

<https://doi.org/10.1128/mBio.00853-19>

CARRETTO, E. et al. Detection of *mcr-4* positive *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in clinical isolates of human origin, Italy, October to November 2016. **Euro Surveillance**, v. 23, n. 2, p. 17-00821, 2018.

<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.2.17-00821>

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. 19, n. 4, p. 295-7, 2013.

<https://doi.org/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, 2017.

<https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1317412>

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Vital Signs: Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.62, n.9, p. 165-170, 2013.

CHAGAS, T. P. et al. Diversity of genotypes in CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in different hospitals in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 420-5, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S1413-86702011000500002>

CHEN, C.J. et al. Molecular analysis of repeated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in children. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e14431, 2010.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014431>

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

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

CHEN, L.F.; ANDERSON, D.J.; PATERSON, D.L. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. **Infection and Drug Resistance**, v. 5, p. 133-141, 2012

<https://doi.org/10.2147/IDR.S26613>

CHENG, Y. et al. Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2909-13, 2015.

<https://doi.org/10.1128/AAC.04763-14>

CHOI, M.J.; KO, K.S. Mutant prevention concentrations of colistin for *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 1, p. 275-277, 2013.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkt315>

CHUNG, P.Y. et al. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 20, p. 1-6, 2016.

<https://doi.org/10.1093/femsle/fnw219>

CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. **CLSI document M100-S24**, 2014.

COMPAIN, F. et al. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4377-4380, 2014.

<https://doi.org/10.1128/JCM.02316-14>

DAEHRE, K. et al. ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* in the broiler production chain and the first description of ST3128. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2302, p. 1-7, 2018.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02302>

DALMOLIN, T. V. et al. Co-occurrence of *mcr-1* and *blaKPC-2* in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 8, p. 2404-2406, 2017.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkx142>

DANTAS, R. C. C. **Estudo epidemiológico molecular da resistência aos carbapenêmicos em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de sangue: produção de b-lactamases, perda de porina OprD e hiperexpressão de bombas de efluxo [tese]**. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, 2015. 105 f.

DANTAS, R.C. et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: independent risk factors for mortality and impact of resistance on outcome. **Journal of Medical Microbiology**, v.63, n.12, p.1679-1687, 2014.

<https://doi.org/10.1099/jmm.0.073262-0>

DANTAS, R.C.C. 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, 2017.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176774>

DANXIA GU, M. S. et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18. n. 1, p. 37-46, 2017.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30489-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30489-9)

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-33, 2010.

<https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>



DERAKHSHAN, S.; NAJAR PEERAYEH, S.; BAKHSHI, B. Association between presence of virulence genes and antibiotic resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Laboratory Medicine**, v. 47, n. 4, p. 306-311, 2016.

<https://doi.org/10.1093/labmed/lmw030>

DHANJI, H. et al. Variation in the genetic environments of bla(CTX-M-15) in *Escherichia coli* from the faeces of travellers returning to the United Kingdom. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 5, p. 1005-12, 2011.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkr041>

DI PILATO, V. et al. Mcr-1.2, a new mcr variant carried on a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain of sequence type 512. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 9, p.5612–5615, 2016.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01075-16>

DU, X. et al. Predictors of mortality in patients infected with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: A systematic review and meta-analysis. **American Journal of Infection Control**. [Epub ahead of print], 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.03.003>

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2017. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Available at [www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints) (Online.)

EYBPOOSH, S. Molecular epidemiology of infectious diseases. **Electronic Physician**, v. 9, n. 8, p. 5149-5158, 2017.

<https://doi.org/10.19082/5149>

FALAGAS, M.E.; MICHALOPOULOS, A. Polymyxins: old antibiotics are back. **The Lancet**, v. 367, n. 9511, p. 633-634, 2006.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68241-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68241-X)

FANG, C. T. et al. *Klebsiella pneumoniae* Genotype K1: An Emerging Pathogen That Causes Septic Ocular or Central Nervous System Complications from Pyogenic Liver Abscess.

**Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 3, p. 284-293, 2007.

<https://doi.org/10.1086/519262>

FERNANDES, M.R. et al. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying mcr-1 gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* sequence type 101 isolate from a human infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6415 - 6417, 2016.

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

FERREIRA, M. L. et al. Association of colistin-resistant KPC clonal strains with subsequent infections and colonization and biofilm production. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 10, p. 1- 9. 2018a.

<https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0043>

FERREIRA, M.L. et al. Detection of ISEcp1-associated bla<sub>CTX-M-15</sub>-mediated resistance to colistin in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 5, p. 810-811, 2018b.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.02.002>

FERREIRA, M.L. et al. Genomic features of clinical ESBL-producing and colistin-resistant hypermucoviscous highly virulent *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* from Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [Epub ahead of print], 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2019.05.003>

FONSECA, E.L. et al. A one-step multiplex PCR to identify *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae* in the clinical routine. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 87, n. 4, p. 315-317. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.005>

FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 49-62, 2014.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>

FU, L. et al. Frequency of virulence factors in high biofilm formation bla<sub>KPC-2</sub> producing *Klebsiella pneumoniae* strains from hospitals. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, p. 168-172, 2018.

<https://doi.org/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, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007>

GALES, A. C.; JONES R. N.; SADER H. S. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 4, p. 315-21, 2006.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01351.x>

GALETTI, R. **Estudo de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamases e de genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos [dissertação]**. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.49 p.

GAN, H.M. et al. Whole-genome sequences of two carbapenem-resistant *Klebsiella quasipneumoniae* strains isolated from a tertiary hospital in Johor, Malaysia. **Genome Announcements**, v. 5, n. 32, p. e00768-17, 2017.

<https://doi.org/10.1128/genomeA.00768-17>

GIACOBBE, D. R. et al. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: results from a multicenter case-control-control study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 12, p. 1106-e1-8, 2015.

GIANI, T. et al. Large nosocomial outbreak of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* traced to clonal expansion of an *mgrB* deletion mutant. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 10, p. 3341–3344, 2015.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01017-15>

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. 652-656, 2010.  
<https://doi.org/10.3747/pdi.2010.00010>

GOERING, R. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p.866-875, 2010.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.07.023>

GONÇALVES, G. B. et al. Spread of multidrug-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones in a tertiary hospital from southern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 56, n. 2017, p. 1-7, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.011>

GONÇALVES, I. R. et al. Outbreaks of colistin-resistant and colistin-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Brazilian intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 4, p. 322-329, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.08.019>

GONÇALVES, I. R. et al. First case of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 of the same pulsotype of multi-drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Minas Gerais, Brazil. **The Journal of Hospital Infection**, v. 99, n. 4, p. 431-432, 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.04.016>

GOOTZ, T.D. The Global Problem of Antibiotic Resistance. **Critical Reviews in Immunology**, v. 30, n. 1, p.79-93, 2010.  
<https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v30.i1.60>

GUDUCUOGLU, H. et al. Hospital Outbreak of a Colistin-Resistant, NDM-1- and OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae*: High Mortality from Pandrug Resistance. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 7, p. 966-972, 2018.  
<https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0173>

GÜLMEZ, D. et al. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 6, p. 523-6, 2008.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.017>

GUPTA, A. et al. Extended Spectrum beta Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* Infections: a Review of the Literature. **Journal of Perinatology**, v. 23, n. 6, p. 439-443, 2003.  
<https://doi.org/10.1038/sj.jp.7210973>

GUTU, A.D. et al. Polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* *phoQ* mutants is dependent on additional two-component regulatory systems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2204-2015, 2013.

<https://doi.org/10.1128/AAC.02353-12>

HAEGGMAN, S. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2400-2408, 2004.

<https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2400-2408.2004>

HALABY, T. et al. Genomic characterization of colistin heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* during a nosocomial outbreak. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6837- 6843, 2016.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01344-16>

HAYAKAWA, K. et al. Growing prevalence of *Providencia stuartii* associated with the increased usage of colistin at a tertiary health care center. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, p. 646-648, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.05.1029>

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. 4469-4474, 2011.

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

HESS, A.S. et al. Prior colonization is associated with increased risk of antibiotic resistant Gram-negative bacteremia in cancer patients. **Diagnostic Microbiology of Infectious Diseases**, v. 79, n. 1, p.7 3–76, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.022>

HOU, X. et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 759-768, 2015.

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

HUICHUAN, Z. et al. The *mcr-1* gene has no effect on colistin resistance when it coexists with inactivated *mgrB* gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 8, p. 1117-20, 2018.

<https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0291>

IREDELL, J.; BROWN, J.; TAGG, K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. **BMJ (Clinical Research ed.)**, 351: h6420, 2016.

<https://doi.org/10.1136/bmj.h6420>

IYAMBA, J.L. et al. Adherence of *Staphylococcus aureus* to catheter tubing inhibition by quaternary ammonium compounds. **The Pan African Medical Journal**, v. 29, n. 50, p. 1-8, 2016.

<https://doi.org/10.11604/pamj.2016.25.50.8134>

JAGNOW, J.; CLEGG, S. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. **Microbiology**, v.149, n. 9, p.2397-2405, 2003.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.26434-0>

JAYOL, A. et al. Acquisition of broad-spectrum cephalosporin resistance leading to colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 3199-3201, 2016.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00237-16>

JOHANSEN, H. K. et al. Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 7, n. 5, p. 391- 397, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.jcf.2008.02.003>

KANG, C.I. et al. Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 760–766, 2005.

<https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.760-766.2005>

KATHRYN, E. H. et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health.

**Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 27, p. 3574-3581, 2015.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1501049112>

KHAERTYNOV, K. S. et al. Virulence Factors and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated From Neonates With Sepsis. **Frontiers in Medicine**, v. 14, n. 5, p. 225, 2018.

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

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, 2008.

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

LA FORGIA, G. M.; COUTTOLENC, B. F.; WASHINGTON, D. C: Hospital performance in Brazil: the search for excellence. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n. 11, p. 2723-2727, 2008.

<https://doi.org/10.1596/978-0-8213-7358-3>

LAVERTY, G.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. **Future Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 509-24, 2013.

<https://doi.org/10.2217/fmb.13.7>

LAVIGNE, J. P. et al. Virulence of *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring bla KPC-2 carbapenemase gene in a *Caenorhabditis elegans* model. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p.e67847, 2013.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067847>

LEE, C. et al. Global dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic context, Treatment options, and Detection methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 1-30, 2016.

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

LI, P. et al. ST37 *Klebsiella pneumoniae*: development of carbapenem resistance in vivo during antimicrobial therapy in neonates. **Future Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 891-904, 2017.

<https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0165>

LI, B. et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. **Future Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1071-81, 2014.

<https://doi.org/10.2217/fmb.14.48>

LIANG, Y. et al. Clonal replacement of epidemic KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in China. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2017.

<https://doi.org/10.1186/s12879-017-2467-9>

LIU, J. et al. Emergence and establishment of KPC-2-producing ST11 *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Shanghai, China. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 2, p. 293-299, 2018.

<https://doi.org/10.1007/s10096-017-3131-4>

LIU, Y. et al. Whole genome assembly and functional portrait of hypervirulent extensively drug-resistant NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* of capsular serotype K2 and ST86. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 5, p. 1233-1240, 2019.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkz023>

LIU, Y. Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)

LODISE, T.P. et al. Predictors of 30-day mortality among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: impact of delayed appropriate antibiotic selection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3510-3515, 2007.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00338-07>

LONG, S.W. et al. Whole-genome sequencing of human clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates reveals misidentification and misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. **mSphere**, v. 2, n. 4, p. e00290-17, 2017.

<https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00290-17>

LORENZONI, V. V. et al. Increased antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* from a University Hospital in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 5, p. 676-679, 2018.

<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0362-2017>

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

[https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01913-2)

MAMMINA, C. et al. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. **Euro Surveillance**, v. 17, n. 33, p. 1-4, 2012.

MARCHAIM, D. et al. Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 593-599, 2011.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01020-10>

MARKOVSKA, R. et al. Clonal dissemination of multilocus sequence type ST15 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. **Apmis**, v. 123, n. 10, p. 887-894, 2015.

<https://doi.org/10.1111/apm.12433>

MARTIN, R.M. et al. Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **mSphere**, v. 1, n. 5, p. e00261-16, 2016.

<https://doi.org/10.1128/mSphere.00261-16>

MATHERS A. J. et al. *Klebsiella quasipneumoniae* provides a window into carbapenemase gene transfer, plasmid rearrangements, and patient interactions with the hospital environment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 6, p. e02513-18, 2019.

<https://doi.org/10.1128/AAC.02513-18>

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, 2015.

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

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. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 565-91, 2015.

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

MELETIS, G.; SKOURA L. Polymyxin Resistance Mechanisms: From Intrinsic Resistance to Mcr Genes. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**, v. 13, n. 3, p. 198-206, 2018.

<https://doi.org/10.2174/1574891X14666181126142704>

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

<https://doi.org/10.1590/S1676-24442006000200007>

MERKIER, A. K. et al. Outbreak of a cluster with epidemic behavior due to *Serratia marcescens* after colistin administration in a hospital setting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 2295-2302, 2013.

<https://doi.org/10.1128/JCM.03280-12>

MERRITT, J. H.; KADOURI, D. E. e O'TOOLE, G. A. **Growing and analyzing static biofilms**. *Current Protocols in Microbiology*, v. Chapter 1, n. August, p. Unit 1B.1, 2005.  
<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00>

MEYER, E. et al. Design of a Surveillance System of Antibiotic Use and Bacterial Resistance in German Intensive Care Units (SARI). **Infection**, v. 31, n. 4, p. 208-215, 2003.

MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 413-451, 2007.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>

MILLER, A.K. et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5761-5769, 2011.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.05391-11>

MISHRA, S.K. et al. Detection of biofilm production and antibiotic resistance pattern in clinical isolates from indwelling medical devices. **Current Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 128-134, 2015.  
<https://doi.org/10.1007/s00284-014-0694-5>

MOFFATT, J.H. et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, n. 12, p. 4971-4977, 2010.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00834-10>

MONACO, M. et al. Colistin resistance super imposed to endemic carbapenem- resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. **Euro Surveillance**, v. 19, n. 42, p. 14-18, 2014.  
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.42.20939>

MONSTEIN, H. J. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes in Enterobacteriaceae. **APMIS**, v. 115, n. 12, p. 1400-1408, 2007.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.00722.x>

MONTEIRO, J. et al. A major monoclonal hospital outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST340 and the first report of ST2570 in Brazil. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 40, n. 4, p. 492-494, 2019.  
<https://doi.org/10.1017/ice.2018.333>

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

MONTEZZI, L.F. et al. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational Waters. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.45, n. 2, p.174-177, 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.10.016>



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, 2013.

<https://doi.org/10.1590/0037-868216722013>

NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 252-275, 2017.

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

NICOLAS, M. F. et al. Comparative genomic analysis of a clinical isolate of *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, a KPC-2 and OKP-B-6 beta-lactamases producer harboring two drug-resistance plasmids from southeast Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 220, p. 1- 16, 2018.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00220>

NICOLETTI, A.G. et al. Clonal Complex 258, the Most Frequently Found Multilocus Sequence Type Complex in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated in Brazilian Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, n.8, p.4563–4564, 2012.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00219-12>

NSOFOR, C.A. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE): Principles and applications in molecular epidemiology: areview. **International Journal of Current Research in Medical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 38-51, 2016.

NUNES, F. **Determinantes genéticos de virulência bacteriana e sua relação com as infecções urinárias como causa primária de bacterémias [dissertação]**. Lisboa: Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 2009. 38 p.

OTTO, M. *Staphylococcal* biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 207-28, 2008.

[https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_10)

\_\_\_\_\_. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 555-67, 2009.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>

\_\_\_\_\_. *Staphylococcal* infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual Review of Medicine**, v. 64, p. 175-88, 2013.

<https://doi.org/10.1146/annurev-med-042711-140023>

PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016.

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

PALMEIRA, J. D. et al. Draft genome of a ST443 *mcr-1*- and *bla*<sub>CTX-M-2</sub>-carrying *Escherichia coli* from cattle in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 13, p. 269-270, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.05.010>

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2702, 2009.

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

PEIRANO, G. et al. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 265-8, 2009.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkn484>

PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 316-321, 2010.

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

PERDIGÃO NETO, L. V. et al. Simultaneous colonization by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* harboring mcr-1 in Brazil. **Infection**, 2019. [Epub ahead of print].

<https://doi.org/10.1007/s15010-019-01309-2>

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). **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 312-316, 2013.

<https://doi.org/10.1093/jac/dks396>

PEREZ, F.; DUIN, D.V. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A menace to our most vulnerable patients. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 80, n. 4, p. 225, 2013.

<https://doi.org/10.3949/ccjm.80a.12182>

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

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70041-0](https://doi.org/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. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5873-84, 2015.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01019-15>

PITT, M. E. et al. Multifactorial chromosomal variants regulate polymyxin resistance in extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 3, p. e000158, 2018.

<https://doi.org/10.1101/134684>

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, 2010.

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

POIREL, L. et al. ISEcp1B-mediated transposition of *bla*<sub>CTX-M</sub> in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 447-450, 2005.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.447-450.2005>

POIREL, L. et al. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 1, p. 75-80, 2015.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dku323>

POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 557-596, 2017.  
<https://doi.org/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, 2013.  
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0199-2013>

QI, Y. et al. ST11, the dominant clone of KPC producing *Klebsiella pneumoniae* in China. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 2, p. 307-12, 2011.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkq431>

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

RAETZ, C.R. et al. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, p. 295, 2007.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803>

ROCHA, F. R.; PINTO, V. P.; BARBOSA, F. C. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 301-11, 2016.  
<https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0180>

ROCHA, F.R. et al. High Frequency of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Strains Isolated from a Teaching Hospital in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, [Epub ahead of print], 2019.  
<https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0142>

ROCHA, L.A. et al. Relationship between nasal colonization and ventilator-associated pneumonia and the role of the environment in transmission of *Staphylococcus aureus* in intensive care units. **American Journal of Infection Control**, v. 41, n. 12, p. 1236-40, 2013.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2013.04.009>

RODRIGUES, A. C. S. et al. Non-clonal occurrence of *pmrB* mutations associated with polymyxin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, p. e180555, 2019.  
<https://doi.org/10.1590/0074-02760180555>

ROER, L. et al. Novel *mcr-3* variant, encoding mobile colistin resistance, in an ST131 *Escherichia coli* isolate from bloodstream infection, Denmark, 2014. **Euro surveillance**, v. 22, n. 31, p. 1-5, 2017.  
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30584>

RUIZ-GARBAJOSA, P. et al. Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 11, p. 2487-2492, 2013.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkt237>

RUSSO, T.A. et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 9, p. e00776-18, 2018.

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

SALMANOV, A. et al. Healthcare-associated infections in intensive care units. **Wiadomosci Lekarskie**, v. 72, n. 5 cz 2, p. 963-969, 2019.

SAMONIS, G. et al. Trends of isolation of intrinsically resistant to colistin Enterobacteriaceae and association with colistin use in a tertiary hospital. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 9, p. 1505-1510, 2014.  
<https://doi.org/10.1007/s10096-014-2097-8>

SAMPAIO, J.L.; GALES, A.C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on  $\beta$ -lactams and polymyxins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 31-37, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.002>

SANCHEZ, C. J. JR. et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. **BMC Infectious Diseases**, v. 29, p. 13-47, 2013.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-47>

SAXENA, S. et al. Comparative Study of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients of Lower Respiratory Tract Infection. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 5, p. 9-11, 2014.

SCHEMBRI, M. A. et al. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 4626-4633, 2005.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4626-4633.2005>

SEKI, L.M. et al. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.70, n. 2, p.274–277, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.01.006>

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

<https://doi.org/10.1128/AAC.01337-07>

SHAH, R. K. et al. The determination and correlation of various virulence genes, ESBL, serum bactericidal effect and biofilm formation of clinical isolated classical *Klebsiella pneumoniae* and Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from respiratory tract infected patients. **Polish Journal of Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 501-508, 2017.

<https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.7042>

SHANKAR, C. et al. Draft genome of a hypervirulent *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* with novel sequence type ST2320 isolated from a chronic liver disease patient. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 9, p. 30-31, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.01.004>

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

<https://doi.org/10.1186/s12866-017-1148-6>

SHANKAR, C. et al. *mgrB* as Hotspot for Insertion Sequence Integration: Change Over from Multidrug-Resistant to Extensively Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*? **Microbial Drug Resistance**, 2019. [Epub ahead of print].

<https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0415>

SHEN, P. et al. Characterization of the genetic environment of the *bla*KPC-2 gene among *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Chinese Hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 4, p. 384-8, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.04.003>

SHENOY, K.J.; JYOTI, E.K.; RAYIKUMAR, R. Phenotypic identification & molecular detection of *bla*<sub>NDM-1</sub> gene in multidrug resistant Gram-negative bacilli in a tertiary care centre. **Indian Journal of Medical Research**. v. 139, n. 4, p. 625–631, 2014.

SHET, A. et al. Colonization and subsequent skin and soft tissue infection due to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a cohort of otherwise healthy adults infected with HIV type 1. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 1, p.88-93, 2009.

<https://doi.org/10.1086/599315>

SINGH, N.S.; SINGHAL, N.; VIRDI, J. S. Genetic Environment of *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CMY-42</sub> and Characterization of Integrons of *Escherichia coli* Isolated From an Indian Urban Aquatic Environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 382, p. 1-8, 2018.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00382>

SNITKIN, E. S. et al. Tracking a Hospital Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Whole-Genome Sequencing. **Science Translational Medicine**, v.4, n.148, p. 1-9, 2012.

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

SONNEVEND, Á. et al. Multi-hospital occurrence of pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST147 with an ISEcp1-directed blaOXA-181 insertion into the *mgrB* gene in the United Arab Emirates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, p. 00418-17, 2017.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00418-17>

STAHLHUT, S. G. et al. Population variability of the FimH type 1 fimbrial adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 6, p. 1941-50, 2009.

<https://doi.org/10.1128/JB.00601-08>

STEIN, A.; RAOULT, D. Colistin: an antimicrobial for the 21<sup>st</sup> century? **Clinical Infectious Diseases**, v.35, n.7, p. 901-902, 2002.

<https://doi.org/10.1086/342570>

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. **Infection and Immunity**, v, 76, n. 9, p. 4055-4065, 2008.

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

SUN, J. et al. Towards understanding MCR-like colistin resistance. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 9, p. 794-808, 2018.

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

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

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

TANWAR, J. et al. Multidrug Resistance: An Emerging Crisis. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2014, n. Article ID 54134, p. 1-7, 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. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 4, p. 528-537, 2018.

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

USEIN, C. R. et al. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 5, n. 3, p. 303-10, 2001.

<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2001.tb00164.x>

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

<https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>

VUOTTO, C. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 1003-1018, 2017.

<https://doi.org/10.1111/jam.13533>

VUOTTO, C. et al. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 743-758, 2014.

<https://doi.org/10.3390/pathogens3030743>

WANG, X. et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2018.

<https://doi.org/10.1038/s41426-018-0124-z>

WOODFORD, N.; TURTON, J.F.; LIVERMORE, D.M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p.736-755, 2011.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>

XAVIER, B. B. et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. **Euro surveillance**, v. 21, n. 27, p. 1-6, 2016.

<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280>

XU, L.; SUN, X.; MA, X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2017.

<https://doi.org/10.1186/s12941-017-0191-3>

XU, Y. et al. Mechanistic insights into transferable polymyxin resistance among gut bacteria. **The Journal of biological chemistry**, v. 293, n. 12, p. 4350-4365, 2018.

<https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000924>

YAN, A.; GUAN, Z.; RAETZ, C.R.H. An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 49, p. 36077-36089, 2007.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M706172200>

YANG, B. et al. Occurrence of *Enterobacter hormaechei* carrying bla<sub>NDM-1</sub> and bla<sub>KPC-2</sub> in China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 90, n. 2, p. 139-142, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.10.007>

YANG, Y. et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 7, p. 1791-1795, 2018.

<https://doi.org/10.1093/jac/dky111>

YANG, Y.Q. et al. Colistin resistance gene mcr-1 and its variant in *Escherichia coli* isolates from chickens in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. e01204-16, 2017.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01204-16>

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, 2001.

<https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>

YONG, D. et al. A novel sub group metallo- $\beta$  -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, 2009.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>

YU, V. L. et al. Virulence characteristics of klebsiella and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 986-993, 2007.

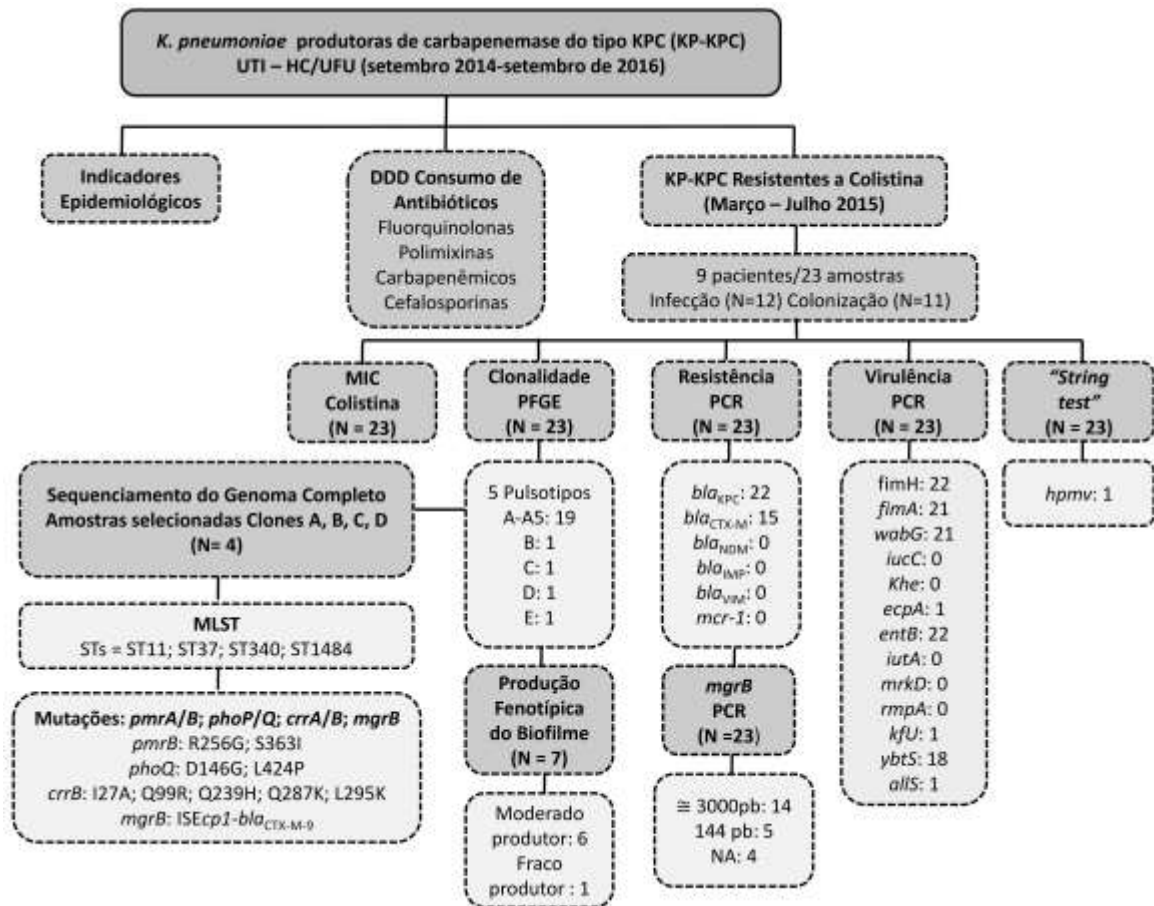
<https://doi.org/10.3201/eid1307.070187>

ZHENG, J. et al. Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia Strains Was Found to be Associated with CC23 and the Presence of *wcaG*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. 21, p. 1-9, 2018.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00021>





## APÊNDICE A



**Apêndice A.** Organograma representativo dos resultados apresentados de acordo com cada metodologia empregada. N, número total; NA, não amplificado.

## ANEXO A

[Pública](#)
[Pesquisador](#)
[Alterar Meus Dados](#)

Paulo Pinto Gontijo Filho - Pesquisador  
 Sua sessão expira em:


---


**DETALHAR PROJETO DE PESQUISA**

---

**DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Mecanismos de resistência aos antibióticos em microrganismos da família Enterobacteriaceae com susceptibilidade diminuída aos carbapenêmicos e sua disseminação através de clones epizóticos de alto risco  
**Pesquisador Responsável:** Paulo Pinto Gontijo Filho  
**Área Temática:**  
**Versão:** 2  
**CAAE:** 44734115.2.0000.5152  
**Submetido em:** 13/07/2015  
**Instituição Proponente:** Instituto de Ciências Biomédicas  
**Situação da Versão do Projeto:** Aprovado  
**Localização atual da Versão do Projeto:** Pesquisador Responsável  
**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio



Comprovante de Recepção:  PS\_COMPROVANTE\_RECEPCAO\_490

---




**DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA**

- ↳ Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 2
  - ↳ Projeto Original (PO) - Versão 2
    - ↳ Currículo dos Assistentes
    - ↳ Documentos do Projeto
      - ↳ Declaração de Instituição e Infraestrutura
      - ↳ Folha de Rosto - Submissão 1
      - ↳ Informações Básicas do Projeto - Subm
      - ↳ Outros - Submissão 1
      - ↳ Projeto Detalhado / Brochura Investigad
      - ↳ TCLE / Termos de Assentimento / Justif
    - ↳ Apreciação 1 - Universidade Federal de Ub
  - ↳ Projeto Completo

Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações

---

**LISTA DE APRECIÇÕES DO PROJETO**

Apreciação *	Pesquisador Responsável †	Versão *	Submissão ‡	Modificação §	Situação ¶	Exclusivo do Centro Coord. ††	Ações
PO	Paulo Pinto Gontijo Filho	2	13/07/2015	03/09/2015	Aprovado	Não	   

---

**HISTÓRICO DE TRÂMITES**

Apreciação	Data/Hora	Tipo Trâmite	Versão	Perfil	Origem	Destino	Informaç
PO	02/09/2015 22:56:29	Parecer liberado	2	Coordenador	Universidade Federal de Uberlândia/MG	PESQUISADOR	
PO	01/09/2015 10:47:36	Parecer do colegiado emitido	2	Coordenador	Universidade Federal de Uberlândia/MG	Universidade Federal de Uberlândia/MG	
PO	27/08/2015 00:02:45	Parecer do relator emitido	2	Membro do CEP	Universidade Federal de Uberlândia/MG	Universidade Federal de Uberlândia/MG	
PO	26/08/2015 23:50:05	Aceitação de Elaboração de Relatoria	2	Membro do CEP	Universidade Federal de Uberlândia/MG	Universidade Federal de Uberlândia/MG	
PO	30/07/2015 16:19:14	Confirmação de indicação de Relatoria			Universidade Federal de Uberlândia/MG		
PO	13/07/2015 14:05:18	Indicação de Relatoria			Universidade Federal de Uberlândia/MG	Universidade Federal de Uberlândia/MG	
PO	13/07/2015 14:05:04	Aceitação do PP			Universidade Federal de Uberlândia/MG	Universidade Federal de Uberlândia/MG	
PO	13/07/2015 13:17:05	Submetido para avaliação do CEP		Pesquisador Principal	PESQUISADOR RESPONSÁVEL	Universidade Federal de Uberlândia/MG	
PO	10/07/2015 11:25:53	Parecer liberado			Universidade Federal de Uberlândia/MG	Universidade Federal de Uberlândia/MG	
PO	08/07/2015 09:31:22	Parecer do colegiado emitido			Universidade Federal de Uberlândia/MG	Universidade Federal de Uberlândia/MG	

Ocorrência 1 a 10 de 20 registro(s)

**PRODUÇÃO CIENTÍFICA**  
(Artigos publicados referentes a tese apresentada)

# Association of Colistin-Resistant KPC Clonal Strains with Subsequent Infections and Colonization and Biofilm Production

Melina Lorraine Ferreira,<sup>1</sup> Bruna Fuga Araújo,<sup>1</sup> Iara Rossi Gonçalves,<sup>1</sup> Sabrina Royer,<sup>1</sup> Paola Amaral Campos,<sup>1</sup> Luiz Gustavo Machado,<sup>1</sup> Deivid William Fonseca Batistão,<sup>2</sup> Cristiane Silveira Brito,<sup>1</sup> Paulo P. Gontijo-Filho,<sup>1</sup> and Rosineide Marques Ribas<sup>1</sup>

Carbapenemase-producing organisms are pandemic and a significant threat to public health. We investigated the clonal relatedness of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing KPC-type carbapenemase (KPC-KP) causing subsequent infections or colonization. Moreover, we aimed to gain insight into the ability of biofilm production in *K. pneumoniae* strains producing carbapenemase. Twenty-two consecutive KPC-KP and one KPC-negative strain was identified from an adult intensive care unit in Brazil. Seventy-five percent of isolates that harbored the *bla*<sub>KPC</sub> gene exhibited genetic relatedness by pulsed-field gel electrophoresis, and none presented the plasmid-mediated *mcr-1* and *bla*<sub>NDM</sub> genes. This study showed that the majority of repeated KPC infections in adults were caused by a clone that caused the previous infections/colonizations even after a long period of time and illustrates the capacity of multiple clones producing biofilms to coexist in the same patient at the same time, becoming a reservoir of KPC-KP in the hospital environment.

**Keywords:** colistin resistant, *Klebsiella pneumoniae*, biofilm formation, colonization, infection, KPC clone

## Introduction

**K**LEBSIELLA PNEUMONIAE CARBAPENEMASES (KPCs) are enzymes that have been of growing concern over the last decade,<sup>1–3</sup> because of their capacity to readily hydrolyze carbapenems and their increased dissemination among gram-negative microorganisms.<sup>4,5</sup> In Brazil, the increase in KPC acquisition in Enterobacteriaceae has been attributed to the propagation of the KPC-2 type, representing a large reservoir of the respective genes.<sup>6,7</sup>

The difficulty in treating severe infections by KPC-producing microorganisms has led to the return of the use of polymyxins (polymyxin B and colistin) worldwide as the last option in the treatment of these infections.<sup>8,9</sup> Unfortunately, the increase in the use of polymyxins in an inappropriate way could be one of the factors leading to the emergence of colistin-resistant KPC-producing strains.<sup>10–12</sup> Colistin resistance can be caused, in addition to other mechanisms, by specific mutations within the *pmrAB* and *phoPQ* genes. Recently, the main mechanism of acquired colistin resistance in *K. pneumoniae* seems to be inactivation of the *mgrB* gene.<sup>13–17</sup>

Early detection of colonization by KPC enables healthcare facilities to contain the spread of these microorganisms through

patient isolation and other measures, as well as preventing the occurrence of adaptations in the strains leading to the emergence of resistance.<sup>3,18</sup> While the indiscriminate use of antimicrobials has played a critical role in our efforts to control epidemic pathogens, there is an urgent need to understand the evolution, adaptation, and spread of drug-resistant strains.<sup>19–21</sup>

In this study, we analyzed all clinical colistin-resistant KPC isolates from patients with repeated infections and colonizations in an adult intensive care unit (ICU) at a tertiary care hospital, where KPC is endemic, during a 2-year period. The aims of this study were to elucidate whether colistin-resistant KPC infection was a relapse of the original KPC clone or reinfection by a new strain. Moreover, we aimed to gain insight into the ability of biofilm production in *K. pneumoniae* strains producing carbapenemase.

## Materials and Methods

### Ethical approval

The research Ethics Committee of the Federal University Uberlandia evaluated and approved our study design (Protocol no. 44734115.2.0000.5152).

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup>Clinical Wards, School of Medicine, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

### Cases, enrollments and definitions

Between September 1, 2014, and September 30, 2016, all KPC clinical isolates (colonization and infections) were collected from the Clinical Microbiology Laboratory of HC-UFU (Clinical Hospital of Federal University of Uberlândia) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . In this study, for molecular analyses, we selected patients with KPC-positive cultures, at least one of them resistant to colistin. In addition, KPC-negative 121KP strain was included in the molecular and biofilm production analyses for epidemiological purposes since it was colistin resistant and has been isolated from a patient also colonized by a KPC-producing colistin-resistant strain (101KPC).

KPC patient-days were calculated for each month from September 2014 to September 2016, as described previously.<sup>22,23</sup> Antimicrobial consumption was expressed as the number of defined daily doses per 1,000 patient-days, as proposed by the World Health Organization.<sup>24</sup> Data collection was conducted using the monthly electronic reports of antibiotic dispensing provided by the hospital pharmacy for the ICU. The antimicrobial agents that were tracked included the following: cephalosporins (ceftriaxone and cefepime), carbapenems (ertapenem, imipenem, and meropenem), fluoroquinolones (ciprofloxacin and levofloxacin), and polymyxins.

Multidrug-resistant (MDR) strains were defined as non-susceptible to at least one agent in three or more antimicrobial categories.<sup>25</sup> Thirty-day mortality was considered the number of deaths of patients with infections during hospitalization, within 30 days of the diagnosis.<sup>26</sup>

Infections were defined as the detection of the bacteria in clinical cultures, associated with clinical signs of infection. Colonization was defined as the presence of KPC in the rectal mucosa.<sup>27</sup>

### Bacterial strains and clinical microbiological testing

Microbial identification and antimicrobial susceptibility testing were performed on the Vitek-2<sup>®</sup> system (bioMérieux, Brazil) for the following antimicrobials: aminoglycosides (gentamicin and amikacin), carbapenems (imipenem and meropenem), cephalosporins (ceftazidime and cefepime), fluoroquinolones (ciprofloxacin and levofloxacin), penicillins plus  $\beta$ -lactamase inhibitors (piperacillin-tazobactam), monobactams (aztreonam), and polymyxins (colistin and polymyxin B). Colistin susceptibility was determined by broth microdilution method according to EUCAST guidelines, and considering resistance to colistin  $>2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ .<sup>28</sup> *Escherichia coli* ATCC 25922 and *E. coli mcr-1* positive strains were used for quality control.

### Molecular testing

The KPC isolates included in the molecular analysis were tested for genes encoding carbapenemases (*bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>NDM</sub>) and the plasmid-mediated *mcr-1* gene by uniplex PCR carried out in a Mastercycler Personal (Eppendorf) as previously described.<sup>29,30</sup> *K. pneumoniae* 740/11, *K. pneumoniae* 3034F-NDM, and *E. coli mcr-1* positive strains were used as controls.

Susceptible and colistin-resistant KPC strains were typed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) as described<sup>31</sup> with modifications. Following the digestion of intact genomic DNA

with the *Xba*I restriction enzyme (Promega, Brazil), *K. pneumoniae* DNA fragments were separated on 1% (w/v) agarose gels in 0.5% TBE (Tris-borate-ethylene diamine tetra-acetic acid [EDTA]) buffer using a CHEF DRIII apparatus (Bio-Rad) with 6 V/cm, pulsed from 5 to 40 sec, for 21 hr at  $12^{\circ}\text{C}$ . Gels were stained with ethidium bromide and photographed under ultraviolet light. Computer-assisted analysis was performed using BioNumerics 5.01 software (Applied Maths, Belgium). Comparison of the banding patterns was accomplished by the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UP-GMA) using the Dice similarity coefficient.

### Investigation of biofilm formation

Seven isolates of *K. pneumoniae* were submitted for the evaluation of biofilm production (40KPC, 42KPC, 60KPC, 85KPC, 89KPC, 101KPC, and 121KP) according to their resistance profile (sensitive or resistant to polymyxin), the source (colonization or infection), and their clonal profile. The isolates were grown for  $18 \pm 2$  hr, at  $37^{\circ}\text{C}$  with shaking at 120 rpm in 20 mL of Tryptic Soy Broth (TSB) using bacteria grown on Tryptic Soy Agar (TSA) plates not older than 2 days as inoculum. After cells were harvested by centrifugation (5,000 rpm, 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), they were washed twice and resuspended in saline (0.9% NaCl prepared in distilled water) at a concentration of  $\sim 1 \times 10^9$  cells/mL, before use in biofilm and adhesion assays. *K. pneumoniae* NTUH-K2044 was used as control.

### Initial adhesion assay

To evaluate the initial adhesion, 200  $\mu\text{L}$  of a cell suspension containing  $1 \times 10^7$  cells/mL prepared in TSB was added to 96-well polystyrene plates. Initial adhesion was allowed to occur for 2 hr at  $37^{\circ}\text{C}$  with rotation at 120 rpm. Bacteria adhered to 96-well polystyrene plates were washed twice with a 0.9% NaCl solution and harvested by scraping of wells for 90 sec. The cell suspension obtained was plated on TSA for colony-forming unit (CFU) enumeration. All experiments were done in quadruplicate, in three independent experiments.

### Biofilm formation assay

Biofilms were formed as described previously,<sup>32</sup> with some modifications. Briefly, 200  $\mu\text{L}$  of a cell suspension containing  $1 \times 10^7$  cells/mL prepared in TSB was added to 96-well polystyrene plates. Biofilm formation was allowed to occur for 24 hr at  $37^{\circ}\text{C}$  with rotation at 120 rpm. Bacteria grown 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 (Merck) fixation, crystal violet (Merck) staining, and acetic acid (Merck) elution as previously described. The eluted dye was removed from each well and placed in a new 96-well microtiter plate, and its absorbance read on an ELISA plate reader (Polaris\_Celer, Brazil) at 570 nm. The experiments were done with eight replicates for each strain, in three independent experiments. TSB without bacteria was used as a negative control. Biofilm production was interpreted according to the criteria of Saxena.<sup>33</sup> The optical density cutoff value (OD<sub>c</sub>) was established as three standard deviations (SDs) above the mean of the optical density (OD) of the negative control:  $\text{OD}_c = \text{average OD of negative control} + 3 \times \text{SD of negative control}$ . For easier interpretation of the results, the strains were divided into the following categories according to

TABLE 1. EPIDEMIOLOGICAL INDICATORS, AVERAGE DEFINED DAILY DOSE PER 1,000 PATIENT-DAYS, AND FREQUENCY OF MORTALITY IN THE INTENSIVE CARE UNIT FROM SEPTEMBER 2014 TO SEPTEMBER 2016

Variables	Values <sup>a</sup>
Patient-days	22.8
Episodes KPC/1,000 patient-days	7.2
KPC infection/1,000 patients-days	2.3
KPC colonization/1,000 patient-days	4.3
CST-R KPC/1,000 patient-days	0.8
CST-R KPC infection/1,000 patient-days	0.3
CST-R KPC colonization/1,000 patient-days	0.4
DDD fluoroquinolones	64.2
DDD polymyxins	158.4
DDD carbapenems	407.3
DDD cephalosporins	508.7
30-days mortality	14.9%

<sup>a</sup>The values are absolute numbers and represent the calculation of each variable entered in the left column.

KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; CST-R, colistin resistant; DDD, defined daily dose per 1000 patient-days; fluoroquinolones, ciprofloxacin and levofloxacin; polymyxins, polymyxin B and colistin; carbapenems, ertapenem, imipenem, and meropenem; cephalosporins, ceftriaxone and cefepime.

their optical densities (ODi):  $OD_i \leq OD_c$  = non-biofilm producer;  $OD_c < OD_i \leq 2 \times OD_c$  = weak biofilm producer;  $2 \times OD_c < OD_i < 4 \times OD_c$  = moderate biofilm producer; and  $4 \times OD_c < OD_i$  = strong biofilm producer.

#### Biofilm cell concentration

The biofilm cell concentration was determined by CFU enumeration. After biofilm formation as described, the biofilms were washed twice with a 0.9% NaCl solution and harvested after scraping the wells for 90 sec. The cell suspension obtained was plated onto TSA plates. All experiments were done in quadruplicate, on three independent occasions.

#### Statistical analysis

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  $p < 0.05$ .

#### Results

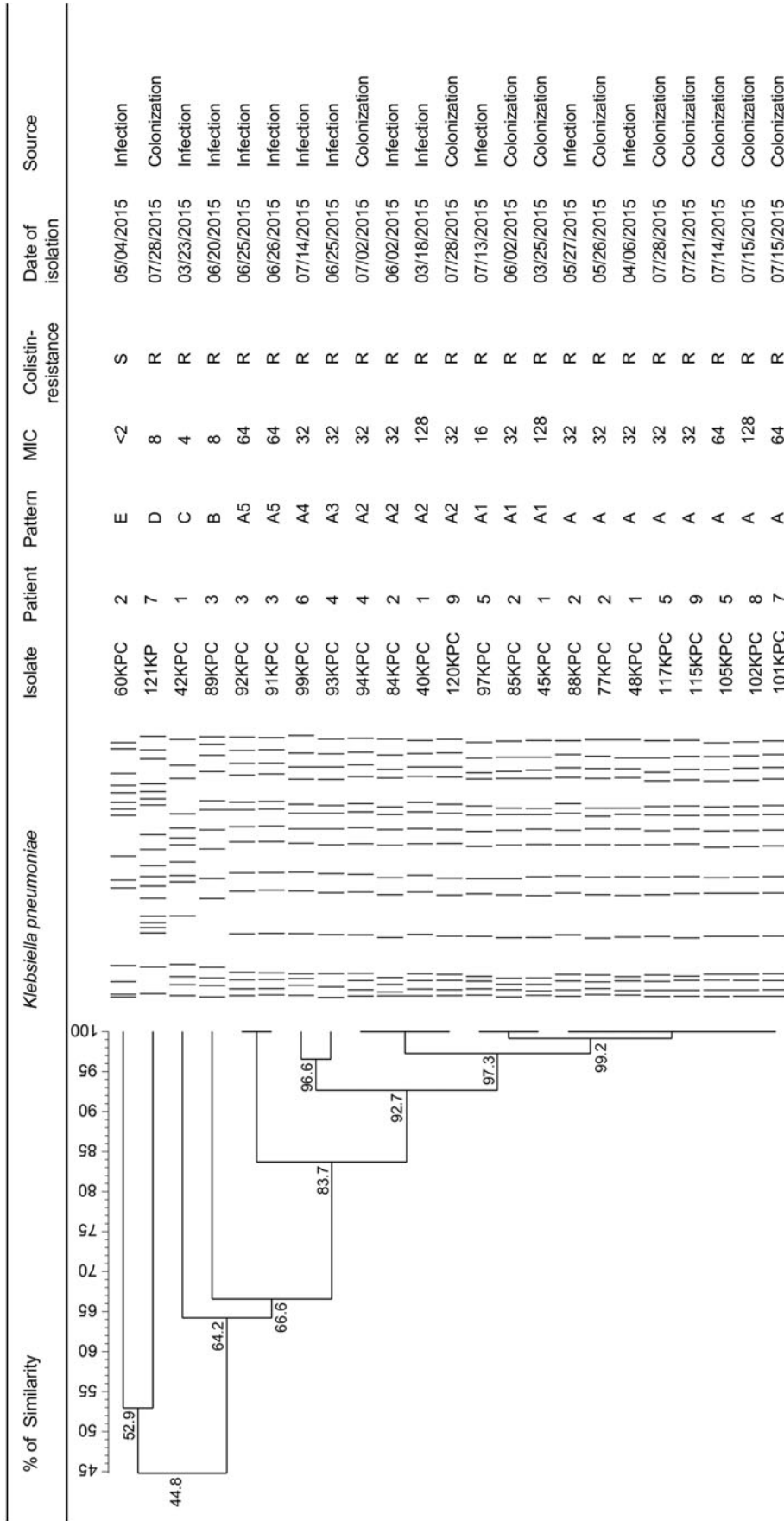
Our results demonstrate the power of combining laboratory infection surveillance and molecular technologies to unravel the molecular aspects, to study the epidemiology of one of the most important gram-negative bacilli today.

Table 1 shows the rates and epidemiological indicators of patients infected and colonized by colistin-resistant and

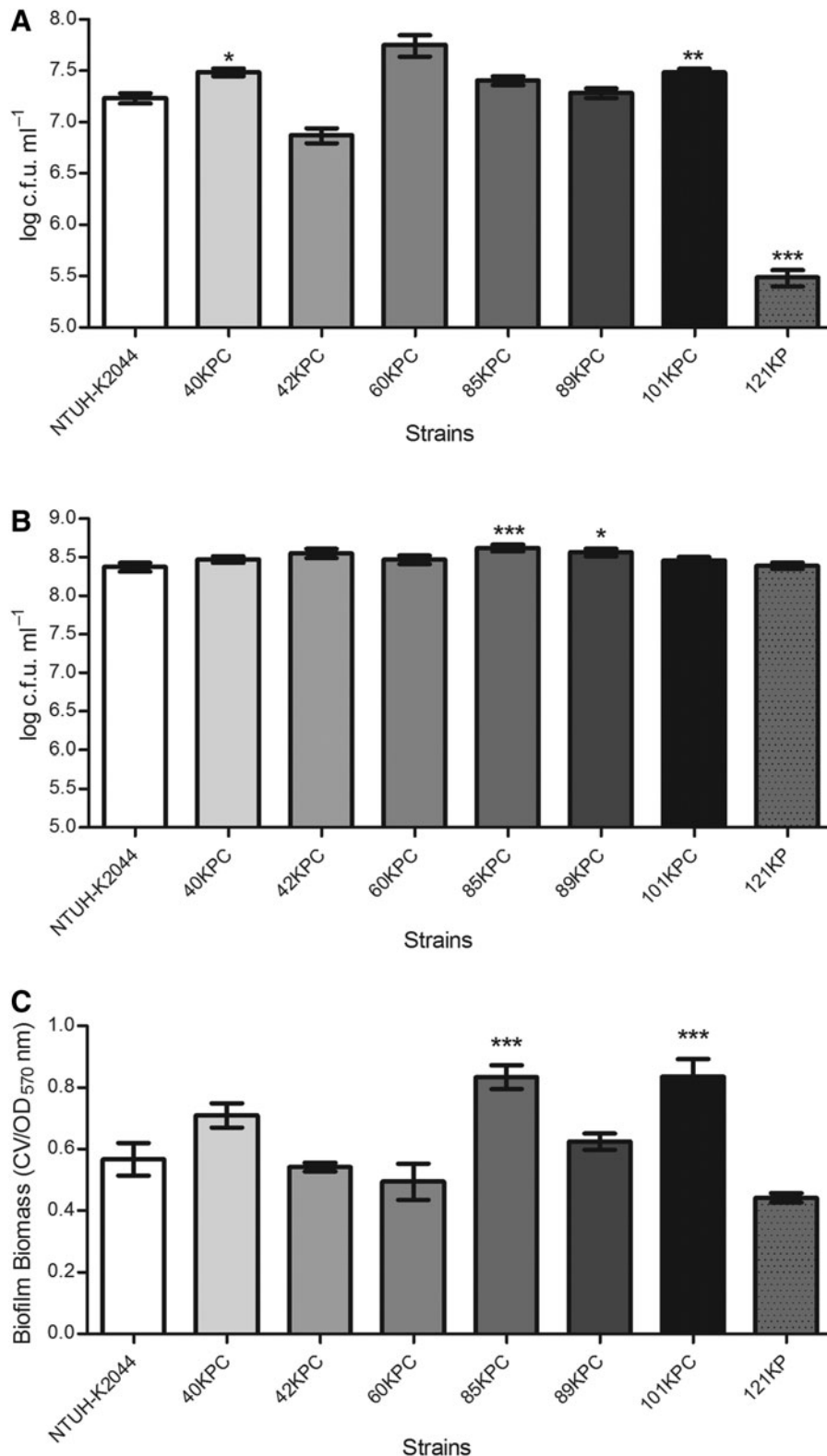
TABLE 2. DEMOGRAPHIC AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH INFECTION AND/OR COLONIZATION DUE TO, AT LEAST, ONE COLISTIN-RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CARBAPENEMASE-PRODUCING ISOLATE IN THE INTENSIVE CARE UNIT FROM SEPTEMBER 2014 TO SEPTEMBER 2016

Patient	Isolate	Date of isolation	Isolate site	Colistin resistance	Pattern PFGE	Hospital stay (days)	Prior antibiotic therapy	Clinical outcome
1	40KPC	03/18/2015	Liquor	Col-R	A2	85	CFZ, FEP, VAN, MEM, CST	Death
	42KPC	03/23/2015	Surgical site	Col-R	C			
	45KPC	03/25/2015	Rectal mucosa	Col-R	A1			
	48KPC	04/06/2015	Liquor	Col-R	A			
2	60KPC	05/04/2015	Lung	Col-S	E	66	TEC, CLI, CRO, CIP, FEP, TZP, SUT, MEM, TGC, CST	Death
	77KPC	05/26/2015	Rectal mucosa	Col-R	A			
	88KPC	05/27/2015	Lung	Col-R	A			
	84KPC	06/02/2015	Lung	Col-R	A2			
	85KPC	06/02/2015	Rectal mucosa	Col-R	A1			
3	89KPC	06/20/2015	Urine	Col-R	B	62	TZP, TEC, MEM, CST, TGC, LVX, IPM	Death
	91KPC	06/26/2015	Lung	Col-R	A5			
	92KPC	06/25/2015	Lung	Col-R	A5			
4	93KPC	06/25/2015	Catheter tip	Col-R	A3	34	CFZ, FEP, VAN, TEC	Death
	94KPC	07/02/2015	Rectal mucosa	Col-R	A2			
5	97KPC	07/13/2015	Lung	Col-R	A1	58	TEC, SAM	Survival
	105KPC	07/14/2015	Rectal mucosa	Col-R	A			
	117KPC	07/28/2015	Rectal mucosa	Col-R	A			
6	99KPC	07/14/2015	Urine	Col-R	A4	58	CFZ, FEP, IMP, CST, VAN	Survival
7	101KPC	07/15/2015	Rectal mucosa	Col-R	A	33	CFZ	Survival
	121KPC	07/28/2015	Rectal mucosa	Col-R	D			
8	102KPC	07/15/2015	Rectal mucosa	Col-R	A	22	CFZ, CFP, VAN, MEM	Survival
9	115KPC	07/21/2015	Rectal mucosa	Col-R	A	25	TZP	Survival
	120KPC	07/28/2015	Rectal mucosa	Col-R	A2			

CFZ, cefazolin; FEP, cefepime; VAN, vancomycin; MEM, meropenem; CST, colistin; TEC, teicoplanin; CLI, clindamycin; CRO, ceftriaxone; CIP, ciprofloxacin; TZP, piperacillin/tazobactam; SUT, sulfamethoxazole; TGC, tigecycline; LVX, levofloxacin; IPM, imipenem; AMK, amikacin; SAM, ampicillin/sulbactam; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis.



**FIG. 1.** UPGMA dendrogram of PFGE profiles of 23 isolates used in this study using Dice coefficient under 1% tolerance and 1% optimization. A similarity coefficient of 80% was chosen for cluster definition. Isolates, patients, patterns, MIC, colistin resistance, date of isolations, and source of the *Klebsiella pneumoniae* isolates. MIC, minimum inhibitory concentration; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; R, resistant; S, susceptible; UPGMA, unweighted pair-group method with arithmetic averages.



**FIG. 2.** Evaluating the number of adhered cells, biomass, and biofilm formation in clinical strains of *K. pneumoniae*. (A) Number of adhered cells onto polystyrene plates after a 2-hr period of contact, expressed by Log CFU/mL; (B) biofilm cellular concentration expressed by Log CFU/mL; (C) biofilm biomass expressed as crystal violet optical density (OD<sub>570</sub> nm). Results represent means + SDs (error bars) of three independent experiments. \* $p=0.01$ , \*\* $p=0.001$ , \*\*\* $p=0.0001$ , using Kruskal–Wallis, Dunn’s multiple comparison test. 193 mm × 284 mm (300 × 300 DPI). CFU, colony-forming unit; OD, optical density; SD, standard deviation.

colistin-susceptible KPC strains, as well as mortality in 30 days. The overall incidence of infection and colonization by KPC in this study was 2.3 and 4.3/1,000 patient-days, respectively. The 30-day mortality rate was 14.9%. The incidence of colistin-resistant KPC/1,000 patient-days was high in this period (0.8/1,000 patient-days).

All isolates included in this study harbored the *bla*<sub>KPC</sub> gene, except for 121KP. None of the strains presented the genes *bla*<sub>NDM</sub> and *mcr-1*. The characteristics of patients with colistin-resistant KPC are shown in Table 2. Among the infected patients, four were colonized by strains of the same clonal profile as the strain that caused infection (patients 1, 2,



TABLE 3. CLASSIFICATION OF BACTERIAL BIOFILM FORMATION BY MICROTITER PLATE METHOD IN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CLINICAL STRAINS

Strains	Mean OD values	Biofilm formation	Resistance	PFGE type	Site of isolation
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044 (control strain)	0.57	Moderate	—	—	—
40KPC	0.71	Moderate	Col-R	A2	Liquor
42KPC	0.54	Moderate	Col-R	C	Surgical site
60KPC	0.49	Moderate	Col-S	E	Respiratory tract
85KPC	0.83	Moderate	Col-R	A1	Rectal swab
89KPC	0.62	Moderate	Col-R	B	Urine
101KPC	0.84	Moderate	Col-R	A	Rectal swab
121KP	0.44	Weak	Col-R	D	Rectal swab

ODc, average OD of negative control + 3× Col-S, colistin susceptible; Col-R, colistin resistant.  
ODc, optical density cutoff value; SD, standard deviation.

4, and 5). Three patients had only colonization, all belonging to clone A (patients 7, 8, and 9), except for a strain in patient 7 that presented as clone D. In infected patients, clone A was the most frequent (75.0%). The coexistence of more than one clonal profile colonizing and/or infecting the same patient at the same time was observed (Table 2).

Although the consumption of antibiotics varied during the period investigated, with high use of all classes, the consumption of carbapenems and cephalosporins was greater (Table 1). Most patients had been treated with carbapenems (55.5%) as prior therapy, followed by polymyxins (44.4%) (Table 2). In this group, four patients received colistin as treatment and four infected patients died within 30 days of diagnosis (Table 2).

A total of five PFGE patterns (A–E) of colistin-resistant and colistin-susceptible KPC strains were observed among the 23 isolates analyzed, with clone A dominant (82.6%) (Fig. 1). The pulsotype A had five subtypes (A1–A5).

It was observed that the strains belonging to clone A showed minimum inhibitory concentrations (MICs) higher than the other clones. There were no differences in the MICs of the infection and colonization strains (Fig. 1).

All *K. pneumoniae* strains assessed were able to adhere to an unmodified polystyrene surface when compared to the positive control *K. pneumoniae* NTUH-K2044 (Fig. 2A). Regarding the number of cells present on each biofilm, the KPC85 and KPC89 strains had the highest number of cells, and there was no significant difference in biofilm formation between the infection and colonization isolates. For the other strains, the production of biofilm was similar to the control (Fig. 2B). The mean of control optical density of the isolates was 0.267 ( $\pm$  0.04). Two isolates (KPC 85 and KPC101) produced more biofilm mass than the control ( $p < 0.001$ ) (Fig. 2C). Quantitatively, biofilm production was moderate in six strains (86%) and weak in one strain (14%). There was no association between colistin resistance and the ability to form biofilm (Table 3).

## Discussion

Altogether, our results reveal the presence of multiple KPC genotypes within a single infection or colonization that can be, at least in part, the result of genetic adaptation of the strain to the human host as well to the hospital environment.

Despite data in the literature, the mechanisms involved in the adaptation of microorganisms to the host need to be further investigated.<sup>34–37</sup>

The reasons for recurrent infections are poorly understood; however, some studies show that colonization is associated with subsequent infections in the same population, especially in hospitalized patients.<sup>38–40</sup> Pathogenic bacteria that are able to persist *in vivo* face strong selective pressure during infection, leading to variations within the clonal lineage.<sup>41</sup> Our study shows that this environment is conducive to this variation, considering the high infection rates per 1,000 patient-days as well as the high use of antibiotics as fluoroquinolones, polymyxins, and  $\beta$ -lactams in the unit.

The results of this study reveal that, among colonized and infected patients, most of colistin-resistant KPC infections were caused by strains genetically indistinguishable from those related to the colonization. It was also observed that nearly 50% of the repeated infections were caused by strains of the same clone that had previously caused infections.

This finding suggests that repeated KPC-resistant infections are caused by a relapse of the previous infecting strain. This observation is similar to that of a previous study that reported methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in children and observed that repeated infections were caused by identical strains, suggesting that the majority of recurrent MRSA infections were a relapse of initial infection.<sup>42</sup> The close association between colonization and the subsequent infection was not demonstrated in colistin-resistant KPC infections in hospitalized adults, until now. Thus, this study provides direct evidence of an association between colonization and the development of infections in these patients.

There are some previous reports of multiple colonization or infections in the same patient.<sup>43,44</sup> However, our study suggests that multiple isolates in the same patient may be related to the propagation of different genetic elements containing resistance genes, as well as the proximity of patients colonized with strains (the same or different clones) that cause infections, in addition to the ease of dissemination by health professional's hand.

The resurgence of polymyxins as last line of therapeutic agents for the treatment of infections caused by MDR gram-negative organisms leads to necessitate investigations into the factors that influence the development of resistance.<sup>8–12</sup> In this

report, we analyzed all clinical colistin-resistant KPC isolates from patients with repeated infections and colonizations in an adult ICU at a tertiary care hospital. Although we have not investigated the mechanisms of colistin resistance in this study, we report an integrate 3.055 bp fragment truncating the *mgrB* gene in the colistin-resistant KPC strain belonging to the dominant clonal profile (40KPC).<sup>45</sup> This fragment consisted of an ISEcp1-*bla*<sub>CTX-M-15</sub> compound transposon, and resulted in concomitantly acquired resistance to broad-spectrum cephalosporins and colistin, being considered the main resistance mechanism to colistin in these isolates. Taken together, these findings show the alarming rate at which resistance to colistin develops in KPC strains.

To the best of our knowledge, this work represents the first comprehensive study in Brazil about whether colistin-resistant KPC infection is a relapse of the original KPC clone or reinfection by a new strain. Based on these findings, the team was interested in investigating the biofilm formation capacity of the colistin-resistant KPC isolates belonging to the different clones, considering that, epidemiologically, biofilm production in KPC infections is associated with nosocomial infections and greater resistance to antibiotics.

Our findings suggest that, under the experimental conditions tested, and considering the importance of these strains in our environment, all were classified as biofilm producers. We believe that this result is very important since these characteristics (biofilm production, KPC production, and colistin resistance) overlap to produce a phenotype that is difficult to treat.

In conclusion, we demonstrated that the majority of repeated KPC infections in adults are caused by the same strain that caused the previous infection/colonization, even after a long period of time, and this study illustrates the capacity of multiple clones producing biofilm to coexist in the same patient at the same time, serving as a constant reservoir of KPC in the hospital environment.

### Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Doroti de Oliveira Garcia (Adolfo Lutz Institute), Dr. Afonso Luis Barth (Federal University of Rio Grande do Sul), and Dr. Nilton Licopan (University of Sao Paulo), who kindly provided the control strains *K. pneumoniae* 740/11, *K. pneumoniae* 3034F-NDM, and *E. coli mcr-1* positive, respectively. This work was supported by the Brazilian Funding Agency CAPES, CNPq and FAPEMIG.

### References

1. Tzouveleki, L.S., A. Markogiannakis, M. Psychogiou, P.T. Tassios, and G.L. Daikos. 2012. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and others Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin. Microbiol. Rev.* 25:682–707.
2. Munoz-Price, L.S., L. Poirel, R.A. Bonomo, M.J. Schwaber, G.L. Daikos, M. Cormican, G. Cornaglia, J. Garau, M. Gniadkowski, M.K. Hayden, K. Kumarasamy, D.M. Livermore, J.J. Maya, P. Nordmann, J.B. Patel, D.L. Paterson, J. Pitout, M.V. Villegas, H. Wang, N. Woodford, and J.P. Quinn. 2013. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect. Dis.* 13:785–796.
3. Saidel-Odes, L., and A. Borer. 2013. Limiting and controlling carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Drug Resist.* 10:9–14.
4. Nordmann, P., G. Cuzon, and T. Naas. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.* 9:228–236.
5. Papp-Wallace, K.M., C.R. Bethel, A.M. Distler, C. Kasuboski, M. Taracila, and R.A. Bonomo. 2010. Inhibitor resistance in the KPC-2 beta-lactamase, a preeminent property of this class A beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:890–897.
6. Seki, L.M., P.S. Pereira, P. de Souza Mda, S. Conceição Mde, E.A. Marques, C.O. Porto, E.M. Colnago, F. Alves Cde, D. Gomes, A.P. Assef, Ø. Samuelsen, and M.D. Asensi. 2011. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70:274–277.
7. Gales, A.C., M. Castanheira, R.N. Jones, and H.S. Sader. 2012. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 73:354–360.
8. Falagas, M.E., and A. Michalopoulos. 2006. Polymyxins: old antibiotics are back. *Lancet* 367:633–634.
9. Biswas, S., J.M. Brunel, J.C. Dubus, M. Reynaud-Gaubert, and J.M. Rolain. 2012. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 10:917–934.
10. Rossi Gonçalves, I., M.L. Ferreira, B.F. Araujo, P.A. Campos, S. Royer, D.W. Batistão, L.P. Souza, C.S. Brito, J.E. Urzedo, P.P. Gontijo-Filho, and R.M. Ribas. 2016. Outbreaks of colistin-resistant and colistin-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Brazilian intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 94:322–329.
11. Chiu, S.K., T.L. Wu, Y.C. Chuang, J.C. Lin, C.P. Fung, P.L. Lu, J.T. Wang, L.S. Wang, L.K. Siu, and K.M. Yeh. 2013. National surveillance study on carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: the emergence and rapid dissemination of KPC-2 carbapenemase. *PLoS One* 8:e69428.
12. Monaco, M., T. Giani, M. Raffone, F. Arena, A. Garcia-Fernandez, S. Pollini; Network EuSCAPE-Italy, H. Grundmann, A. Pantosti, and G.M. Rossolini. 2014. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. *Euro. Surveill.* 19:20939.
13. Nordmann, P., A. Jayol, and L. Poirel. 2016. Rapid detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. *Emerg. Infect. Dis.* 22:1038–1043.
14. Cheng, Y.H., T.L. Lin, Y.J. Pan, Y.P. Wang, Y.T. Lin, and J.T. Wang. 2015. Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59:2909–2913.
15. Olaitan, A.O., S.M. Diene, M. Kempf, M. Berrazeg, S. Bakour, S.K. Gupta, B. Thongmalayvong, K. Akkhavong, S. Somphavong, P. Paboriboune, K. Chaisiri, C. Komalamisra, O.O. Adelowo, O.E. Fagade, O.A. Banjo, A.J. Oke, A. Adler, M.V. Assous, S. Morand, D. Raoult, and J.M. Rolain. 2014. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator *mgrB*: an

- epidemiological and molecular study. *Int. J. Antimicrob. Agents* 44:500–507.
16. Cannatelli, A., T. Giani, M.M. D'Andrea, V. Di Pilato, F. Arena, V. Conte, K. Tryfinopoulou, A. Vatopoulos, and G. Rossolini. 2014. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58:5696–5703.
  17. Poirel, L., A. Jayol, S. Bontron, M.V. Villegas, M. Ozdamar, S. Turkoglu, and P. Nordmann. 2015. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 70:75–80.
  18. Palmore, T.N., and D.K. Henderson. 2013. Managing transmission of carbapenem resistant enterobacteriaceae in healthcare settings: a view from the trenches. *Clin. Infect. Dis.* 57:1593–1599.
  19. Aleksun, M.N., and S.B. Levy. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128:1037–1050.
  20. MacLean, R.C., A.R. Hall, G.G. Perron, and A. Buckling. 2010. The population genetics of antibiotic resistance: integrating molecular mechanisms and treatment contexts. *Nat. Rev. Genet.* 11:405–414.
  21. Hermsen, R., J.B. Deris, and T. Hwa. 2012. On the rapidity of antibiotic resistance evolution facilitated by a concentration gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:10775–10780.
  22. Williams, V.R., S. Callery, M. Vearncombe, and A.E. Simor. 2009. The role of colonization pressure in nosocomial transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Infect. Control* 37:106–110.
  23. Khanfar, H., A. Senok, A. Anani, and V. Zinkevich. 2012. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* transmission in a low prevalence healthcare setting. *J. Infect. Public Health* 5:311–316.
  24. World Health Organization. 2015. Guidelines for ATC classification and DDD assignment. Available at [www.whooc.no/atc\\_ddd\\_publications/guidelines](http://www.whooc.no/atc_ddd_publications/guidelines) (Online.) (accessed April 1, 2018).
  25. Magiorakos, A.P., A. Srinivasan, R.B. Carey, Y. Carmeli, M.E. Falagas, C.G. Giske, S. Harbarth, J.F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D.L. Paterson, L.B. Rice, J. Stelling, M.J. Struelens, A. Vatopoulos, J.T. Weber, and D.L. Monnet. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:268–281.
  26. Lodise, T.P., Jr., N. Patel, A. Kwa, J. Graves, J.P. Furuno, E. Graffunder, B. Lomaestro, and J.C. McGregor. 2007. Predictors of 30-day mortality among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: impact of delayed appropriate antibiotic selection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3510–3515.
  27. Zuckerman, T., N. Benyamini, H. Sprecher, R. Fineman, R. Finkelstein, J.M. Rowe, and I. Oren. 2011. SCT in patients with carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*: a single center experience with oral gentamicin for the eradication of carrier state. *Bone Marrow Transplant.* 46:1226–1230.
  28. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2017. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Available at [www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints) (Online.) (accessed April 1, 2018).
  29. Poirel, L., T.R. Walsh, V. Cuvillier, and P. Nordmann. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70:119–123.
  30. Liu, Y.Y., Y. Wang, T.R. Walsh, L.X. Yi, R. Zhang, J. Spencer, Y. Doi, G. Tian, B. Dong, X. Huang, L.F. Yu, D. Gu, H. Ren, X. Chen, L. Lv, D. He, H. Zhou, Z. Liang, J.H. Liu, and J. Shen. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 16:161–168.
  31. Galetti, R. Estudo de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalobeta-lactamase e de genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos [Study of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and genes involved in carbapenem resistance]. 2010. Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo. (In Portuguese.)
  32. Cassat, J.E., M.S. Smeltzer, and C.Y. Lee. 2014. Investigation of biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *MTDS Mol. Biol.* 1085:195–211.
  33. Saxena, S., G. Banerjee, R. Garg, and M. Singh. Comparative study of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients of lower respiratory tract infection. *J. Clin. Diagn. Res.* 8:DC09–DC11.
  34. Barrick, J.E., D.S. Yu, S.H. Yoon, H. Jeong, T.K. Oh, D. Schneider, R.E. Lenski, and J.F. Kim. 2009. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature* 461:1243–1247.
  35. Falush, D. 2009. Toward the use of genomics to study microevolutionary change in bacteria. *PLoS Genet.* 5:e1000627.
  36. Matyushkina, D., O. Pobeguts, I. Butenko, A. Vanyushkina, N. Anikanov, O. Bukato, D. Evsyutina, A. Bogomazova, M. Lagarkova, T. Semashko, I. Garanina, V. Babenko, M. Vakhitova, V. Ladygina, G. Fisunov, and V. Govorun. 2016. Phase transition of the bacterium upon invasion of a host cell as a mechanism of adaptation: a *Mycoplasma gallisepticum* model. *Sci. Rep.* 6:35959.
  37. Gomez-Simmonds, A., and A.C. Uhlemann. 2017. Clinical implications of genomic adaptation and evolution carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 215(Suppl\_1):S18–S27.
  38. Shet, A., B. Mathema, J.R. Mediavilla, K. Kishii, S. Mehandru, P. Jeane-Pierre, M. Laroche, B.M. Willey, N. Kreiswirth, M. Markowitz, and B.N. Kreiswirth. 2009. Colonization and subsequent skin and soft tissue infection due to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a cohort of otherwise healthy adults infected with HIV type 1. *J. Infect. Dis.* 200:88–93.
  39. Hess, A.S., M. Kleinberg, J.D. Sorkin, G. Netzer, J.K. Johnson, M. Shardell, K.A. Thom, A.D. Harris, and M.C. Roghmann. 2014. Prior colonization is associated with increased risk of antibiotic-resistant Gram-negative bacteremia in cancer patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 79:73–76.
  40. Martin, R.M., J. Cao, S. Brisse, V. Passet, W. Wu, L. Zhao, P.N. Malani, K. Rao, and M.A. Bachman. 2016. Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere* 1:e00261–16.
  41. Hayden, H.S., R. Lim, M.J. Brittnacher, E.H. Sims, E.R. Ramage, C. Fong, Z. Wu, E. Crist, J. Chang, Y. Zhou, M. Radey, L. Rohmer, E. Haugen, W. Gillett, V. Wuthiekanun, S.J. Peacock, R. Kaul, S.I. Miller, C. Manoil, and M.A.

- Jacobs. 2012. Evolution of *Burkholderia pseudomallei* in recurrent melioidosis. PLoS One 7:e36507.
42. Chen, C.J., L.H. Su, T.Y. Lin, and Y.C. Huang. 2010. Molecular analysis of repeated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in children. PLoS One 5:e14431.
43. Sidjabat, H.E., F.P. Silveira, B.A. Potoski, K.M. Abu-Elmagd, J.M. Adams-Haduch, D.L. Paterson, and Y. Doi. 2009. Interspecies spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene in a single patient. Clin. Infect. Dis. 49:1736–1738.
44. Mulvey, M.R., L.P. Haraoui, and Y. Longtin. 2016. Multiple variants of *Klebsiella pneumoniae* producing carbapenemase in one patient. N. Engl. J. Med. 375:2408–2410.
45. Ferreira, M.L., I.R. Gonçalves, B.F. Araújo, S. Royer, P.A. Campos, Batistão DWDF, L.T. Cerdeira, C.S. de Brito, P.P. Gontijo-Filho, and R.M. Ribas. 2018. Detection of ISEcp1-

associated *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-mediated resistance to colistin in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. Int. J. Antimicrob. Agents; [Epub ahead of print]; DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.02.002.

Address correspondence to:  
Rosineide Marques Ribas, PhD  
Laboratory of Molecular Microbiology  
Institute of Biomedical Sciences (ICBIM)  
Federal University of Uberlandia  
Uberlandia  
Minas Gerais 38405-320  
Brazil

E-mail: rosi\_ribas@yahoo.com.br

quantified in parallel by plating serial dilutions on LB agar plates and transformation events were determined by calculating the number of kanamycin-resistant colonies per CFU. Experiments were performed in at least triplicate, statistical analysis (Mann-Whitney Test) was performed using PrismPad (GraphPad software, San Diego, CA, USA) and a *P*-value < 0.05 was considered significant.

MMC functions by cross-linking complimentary DNA strands and has been shown to induce the DNA repair (SOS) response pathway in several bacteria, to increase transformation frequencies in *Legionella pneumophila* and to increase genes associated with stress response in *A. baumannii* and *Acinetobacter baylyi* [7]. The minimum inhibitory concentration (MIC) of MMC on *A. baumannii* A118 cells was determined to be 3.125 µg/mL and a concentration of 0.2 µg/mL was used during transformation assays. While transformation frequencies increased with all strains and DNA types under MMC induction, strain ATCC 17978 and ATCC 19606 showed significant increases, with ATCC 17978 showing the most dramatic increases of 19.83-fold with plasmid DNA and 13.04-fold with genomic DNA (Fig. 1A). NAL is a synthetic quinolone antibiotic that functions by inhibiting DNA gyrase and/or topoisomerase. The MIC of NAL was determined as 5 µg/mL and it was tested at a concentration of 1.25 µg/mL. As with MMC, NAL increased transformation frequencies in all strains with both DNA types but only significantly increased transformation frequencies in strain A42, transformed with plasmid DNA (Fig. 1B). MEM is a carbapenem that functions by inhibiting the formation of peptidoglycan in the cell wall and is considered the last line of defense in treating infections caused by Gram-negative multidrug-resistant bacteria. The MIC of MEM was determined to be 0.25 µg/mL and a concentration of 0.063 µg/mL was used for transformation. As with the previously described antibiotics, MEM increased transformation frequencies in all strains tested with both DNA types. However, it significantly increased transformation frequencies by 12.12-fold in ATCC 17978, when transformed with plasmid DNA, and 3.14-fold in A42, when transformed with genomic DNA (Fig. 1C).

As MMC and NAL target the bacterial genome, it is likely that they induce competence via the unique DNA damage stress response pathway of *A. baumannii*. In many bacterial species, DNA damage triggers RecA-dependent autoproteolysis of the LexA repressor, but this does not occur in *A. baumannii* because of the absence of several crucial genes, including *lexA* [8]. Instead, we hypothesize that *A. baumannii*, like *A. baylyi*, responds to DNA damage in a RecA-independent manner, in which RecA is involved in DNA repair as a member of the recombination repair pathway, and that competence developed as a DNA damage response mechanism in this species. The role of MEM is not as clear. Although carbapenems like MEM have been shown to increase plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae* by inducing expression of the CRISPR-cas activity regulator, H-NS, the CRISPR-cas system was not identified in any of the tested *A. baumannii* strains [9]. As such, carbapenems may interact with the H-NS regulator to induce competence via a novel pathway. Together, these results indicate there are multiple pathways to competence induction in *A. baumannii* and that further analysis of these pathways is crucial to understanding how competence functions in this species.

**Funding:** BQ was supported by grant MHIRT 2T37MD001368 from the National Institute on Minority Health and Health Disparities, National Institute of Health.

**Competing interests:** No.

**Ethical approval:** Not required.

## References

- Traglia GM, Quinn B, Schramm ST, Soler-Bistue A, Ramirez MS. Serum albumin and Ca<sup>2+</sup> are natural competence inducers in the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:4920–9.
- Tacconelli E, Magrini N. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *World Health Organization*; 2017.
- Quinn B, Traglia GM, Nguyen M, Martinez J, Liu C, Fernandez JS, et al. Effect of host human products on natural transformation in *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol* 2018;doi:10.1007/s00284-017-1417-5.
- Ramirez MS, Don M, Merkier AK, Bistue AJS, Zorreguieta A, Centron D, et al. Naturally competent *Acinetobacter baumannii* clinical isolate as a convenient model for genetic studies. *J Clin Microbiol* 2010;48:1488–90.
- Charpentier X, Kay E, Schneider D, Shuman HA. Antibiotics and UV radiation induce competence for natural transformation in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* 2011;193:1114–21.
- Prudhomme M, Attaiech L, Sanchez G, Martin B, Claverys JP. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 2006;313:89–92.
- Charpentier X, Polard P, Claverys JP. Induction of competence for genetic transformation by antibiotics: convergent evolution of stress responses in distant bacterial species lacking SOS? *Curr Opin Microbiol* 2012;15:570–6.
- Robinson A, Brzoska AJ, Turner KM, Withers R, Harry EJ, Lewis PJ, et al. Essential biological processes of an emerging pathogen: DNA replication, transcription, and cell division in *Acinetobacter* spp. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010;74:273–97.
- Lin TL, Pan YJ, Hsieh PF, Hsu CR, Wu MC, Wang JT. Imipenem represses CRISPR-Cas interference of DNA acquisition through H-NS stimulation in *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep* 2016;6:31644.

Brettni Quinn  
Jasmine Martinez  
Christine Liu  
Meaghan Nguyen  
Maria Soledad Ramirez \*

Center for Applied Biotechnology Studies, Department of Biological Science, College of Natural Sciences and Mathematics, California State University Fullerton, Fullerton, California, USA

\* Corresponding author. Department of Biological Science, California State University Fullerton, Fullerton, CA, USA. E-mail address: msramirez@fullerton.edu (M.S. Ramirez).

18 December 2017

27 January 2018

## Detection of ISEcp1-associated bla<sub>CTX-M-15</sub>-mediated resistance to colistin in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates

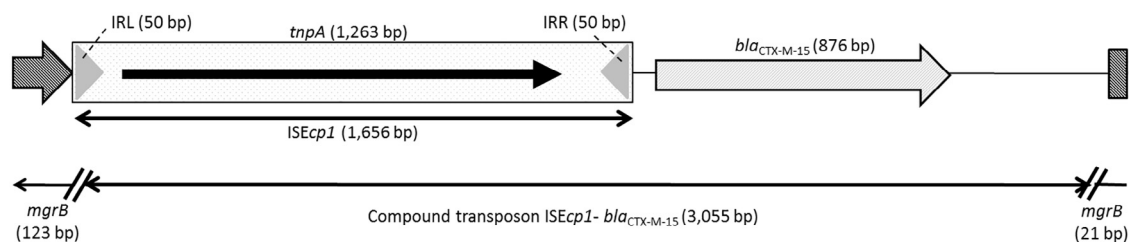


Sir,

The difficulty in treating severe infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (KPC-KP) has led to the worldwide reoccurrence of the use of polymyxins (polymyxin B and colistin) as a last treatment option [1]. Unfortunately, the increasing use of polymyxins has led to reports of colistin-resistant KPC-producing isolates around the world [1,2]. Polymyxin resistance is associated with specific modifications of the lipid A component of bacterial lipopolysaccharide (LPS) that reduce the negative charge of the outer membrane. These modifications have been reported to be because of specific alterations in the pmrA/B and phoP/Q two-component systems [3]. Recent reports indicate that the main colistin resistance mechanism in *K. pneumoniae* is associated with inactivation of the *mgrB* gene [4].

In this study, we investigated whether there were changes in the *mgrB* gene that justified the high level of colistin resistance found in a dominant clone of KPC-KP isolates that caused a major outbreak in Brazil.

A total of 13 colistin-resistant KPC-KP isolates were collected during a major outbreak in July 2015 in the adult intensive care unit of a Brazilian teaching hospital [2]. Species identification and antimicrobial susceptibility were performed on the Vitek-2® system (bioMérieux, Brazil). Colistin susceptibility was determined by the broth microdilution method according to EUCAST guidelines and >2 µg/mL was considered as resistance to colistin. The study conducted by Rossi et al confirmed clone A to be dominant among the outbreak isolates [2]. All isolates were tested for the presence



**Fig. 1.** Schematic representation of the *mgrB* gene by the *ISEcp1-bla<sub>CTX-M-15</sub>* in *K. pneumoniae* isolate KPC40. Arrows indicate genes and their respective transcription orientations. IRL, inverted repeated left; IRR, inverted repeated right. The *mgrB* gene truncation is represented by diagonal dashes. *tnpA* corresponds to the transposase-encoding gene of *ISEcp1*.

of the plasmid-mediated *mcr-1* gene by polymerase chain reaction (PCR), and none were shown to harbor this gene.

The whole genome of the 40KPC strain (colistin-resistant KPC-KP strain; MIC of colistin, 128 µg/mL; date of infection, 03/18/2015) was sequenced on an Illumina MiSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA), and the genome library was constructed using the Nextera XT DNA sample prep kit (Illumina).

The analysis revealed that the strain belonging to the sequencing type (ST) 11 was closely related to the clonal complex (CC) 258, which is the main clonal group among *K. pneumoniae* harboring *bla<sub>KPC</sub>* in Latin America [5]. A sequence analysis of the genes encoding *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ* and *mgrB* was aligned with the genomic DNA of the NTUH-K2044 strain. We identified an integrate 3.055 bp fragment truncating the *mgrB* gene. This truncation occurred between nucleotides +21 and +22 and the inserted fragment consisted of an *ISEcp1-bla<sub>CTX-M-15</sub>* compound transposon (Fig. 1). In addition to this alteration in the *mgrB* gene, two other mutations were detected, in the *pmrB* gene (R256G) and the *phoQ* gene (D146G).

This study shows that insertion of the *bla<sub>CTX-M-15</sub>* gene, along with the insertion element *ISEcp1*, into the chromosomally-located *mgrB* gene resulted in concomitantly acquired resistance to broad-spectrum cephalosporins and colistin, and was considered the main resistance mechanism to colistin in these isolates. This sequence has been observed previously in a study conducted by Jayol et al in France [6]. Although we detected two other mutations—R256G and D146G in the *pmrB* and *phoQ* genes, respectively—the most important finding was that *bla<sub>CTX-M-15</sub>* was associated with an *ISEcp1* insertion sequence in the *mgrB* gene.

Additionally, ~3000 bp fragments of the *mgrB* amplicons were observed in gel electrophoresis in the other isolates from the outbreak. These larger fragments are likely to correspond to the *mgrB* gene truncated by the *bla<sub>CTX-M-15</sub>* gene, along with the insertion element *ISEcp1*. This observation reinforces the idea that the *mgrB* gene contains additional elements related to this gene.

Our study adds to the findings reported by de Jayol et al [6], and provides further evidence to indicate that resistance to broad-spectrum cephalosporins may be associated with resistance to colistin in *K. pneumoniae* in the hospital environment.

In conclusion, this study provides evidence that insertion of the *bla<sub>CTX-M-15</sub>* gene along with the *ISEcp1* element into the *mgrB* gene in a highly-resistant strain recovered from an environment with high use of antibiotics [2] led to colistin resistance.

**Accession number.** The sequence of the KPC40 strain was deposited in GenBank with accession number NIRG00000000.

#### Acknowledgements

The authors wish to thank members of Laboratory of Bacterial Resistance and Therapeutic Alternatives, Department of Microbiology—ICBII / USP, especially Dr Nilton Licopan for assisting in the analysis of sequencing. We are grateful to Dr Nilton Licopan (University of Sao Paulo), who kindly provided the control strain *E. coli mcr-1* positive.

**Funding:** This work was supported by the Brazilian Funding Agency CAPES, CNPq and FAPEMIG.

**Competing interests:** There are no conflicts of interest.

**Ethical approval:** Not required.

#### References

- [1] Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, Berrazeg M, Bakour S, Gupta SK, et al. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator *mgrB*: an epidemiological and molecular study. *Int J Antimicrob Agents* 2014;44:500–7.
- [2] Rossi Gonçalves I, Ferreira ML, Araujo BF, Campos PA, Royer S, Batistão DW, et al. Outbreaks of colistin-resistant and colistin-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Brazilian intensive care unit. *J Hosp Infect* 2016;94:322–9.
- [3] Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* 2014;5:643.
- [4] Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Turkoglu S, et al. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:75–80.
- [5] Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol* 2014;12:686–96.
- [6] Jayol A, Nordmann P, Desroches M, Decousser JW, Poirel L. Acquisition of broad-spectrum cephalosporin resistance leading to colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:3199–201.

Melina Lorraine Ferreira  
Iara Rossi Gonçalves  
Bruna Fuga Araújo  
Sabrina Royer  
Paola Amaral Campos

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

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

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

Cristiane Silveira de Brito  
Paulo P. Gontijo-Filho  
Rosineide Marques Ribas\*  
*Institute of Biomedical Sciences, Laboratory of Molecular Microbiology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil*

\* Corresponding author. Institute of Biomedical Sciences, Laboratory of Molecular Microbiology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.  
E-mail address: rosi\_ribas@yahoo.com.br (R.M. Ribas)

7 November 2017

3 February 2018



# The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES

[www.elsevier.com/locate/bjid](http://www.elsevier.com/locate/bjid)



## Letter to the editor

# Genomic features of a clinical ESBL-producing and colistin-resistant hypermucoviscous *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* from Brazil

Melina Lorraine Ferreira<sup>a</sup>, Bruna Fuga Araújo<sup>a</sup>, Louise Teixeira Cerdeira<sup>b</sup>, César Toshio<sup>c</sup>, Rosineide Marques Ribas<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), Laboratory of Molecular Microbiology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Department of Microbiology, Laboratory of Bacterial Resistance and Therapeutic Alternatives, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Department of Preventive Veterinary Medicine, Laboratory of Bacteriology in Fish, University of Londrina, Paraná, Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 14 December 2018

Accepted 12 May 2019

Available online xxx

Dear Editor:

*Klebsiella pneumoniae* is widely recognized as a significant threat to human health, probably associated to the emergence of hypervirulent and pan-resistant strains associated with hospital infections.<sup>1</sup> *Klebsiella quasipneumoniae* is a novel, recently described, bacterial species which can be as virulent as other *K. pneumoniae* strains, causing invasive infections and resulting in high mortality rates.<sup>2</sup> In this report, we report the first draft genome of a clinical ESBL-producing, colistin-resistant, highly virulent and hypermucoviscous *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* isolate in Brazil.

The KP121 strain was isolated from the rectal mucosa of a patient in a teaching hospital in Southeastern Brazil, on July 28, 2015. It was formerly characterized as *K. pneumoniae*

at the hospital by the Vitek-2<sup>®</sup> system (bioMérieux, Brazil). Antimicrobial susceptibility tests were performed by Microflex TM matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS; Bruker Daltonics, Bremen, Germany), remaining sensitive to ciprofloxacin and tigecycline. Colistin susceptibility was confirmed by the broth microdilution method according to EUCAST guidelines, and >2 µg/mL was considered resistant to colistin. It is important to note that, 13 days prior to sample isolation, the patient was colonized at the same site by a KPC-producing *K. pneumoniae* (positive *bla*<sub>KPC</sub> gene), both from different clones assessed by PFGE.<sup>3</sup> At the time of KP121 strain isolation, the patient was on ceftriaxone, cefepime, and vancomycin due to other hospital infections, and was discharged 14 days after.

Total genomic DNA of the strain was subjected to whole genome sequencing (WGS) using Illumina NextSeq 500 sequencer (Illumina, San Diego, CA). Sequence reads were *de novo* assembled using the Velvet pipeline

\* Corresponding author.

E-mail address: [rosi.ribas@yahoo.com.br](mailto:rosi.ribas@yahoo.com.br) (R.M. Ribas).

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2019.05.003>

1413-8670/© 2019 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Table 1 – Average nucleotide identity of KP121 genome against *Klebsiella* genomes.**

Query <i>Klebsiella</i> genome	Size (nucleotides)	DNA (G+C) content (%)	ANI of KP121 against query genome
<i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i> UCICRE (KI535451)	5,263,297	58.16	96.71%
<i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> KP142 (CP023478)	5,217,300	57.85	98.98%
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> KPC42 (NZ_QODD000000000)	5,315,950	57.37	93.90%
<i>K. variicola</i> at-22 (NC_013850)	5,458,505	57.58	93.60

(version 5.0.1) and Geneious (version R9). This assembly was submitted for annotation using the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline, and pairwise alignment was performed by BLASTn homology searches (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Multilocus sequence typing (MLST) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>), Resfinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>) and PlasmidFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) were used to determine the sequence type, antibiotic resistance genes, and plasmid types present in the isolate. The BLASTn tool and the pairwise alignment of Geneious also allowed comparisons with the genomic DNA of the NTUH-K2044 strain. We examined chromosomal mutations in genes encoding *PhoP/Q*, *PmrA/B* and *CrrA/B* two-component systems and mutations or insertions in *mgrB*.

Analyses revealed that the strain belonged to the sequencing type (ST) 1484. KP 121 was identified as *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* based on two criteria: (i) a high pairwise average nucleotide identity (ANI) of 98.98% with the reference strain KP142 (CP023478.1); and (ii) presence of the *bla<sub>QKP-B-2</sub>* gene (Table 1). The strain was placed in the KPIIb phylogroup which further supported subspecies classification. This strain presented the *wzi* sequence (*wzi* allele: 251) assigned to the (K-loci)-type KL16 (<http://bigsdw.web.pasteur.fr/klebsiella>).

Although *K. pneumoniae* is the most clinically relevant species within the genus,<sup>2</sup> the emergence and description of a closely related highly virulent subspecies, hypermucoviscous and with extensive drug-resistant characteristics is significant, as it may be another important resistance and virulence gene reservoir. In epidemiological terms, plasmids from the incompatibility group IncHI2 were found which, according to the literature, are associated with multidrug-resistant (MDR) isolates.<sup>4</sup>

Although it belongs to the capsular type 16, the hypermucoviscosity characteristic of this strain was confirmed by the phenotypic test according to Catalán-Nájera et al.,<sup>5</sup> which evidenced  $\square$ 5 mm strings. In addition, the strain presented virulence genes encoding the aerobactin (*iutA*), type 1 fimbriae (*fimABCDEFGHIK*), type 3 fimbriae (*mrkABCFHJ*), *Escherichia coli* common pilus (*ecpA*), outer core lipopolysaccharide (*wabG*), enterobactin (*entB*), urease synthesis associated genes (*ureADE*), *allABCDRS*, *KfuABC*, *ugE* and *traT*. In addition, this strain also produces a moderate level of biofilm.<sup>3</sup>

Previously published studies have assessed healthcare-associated infections (HAI) epidemiology caused by MDR microorganisms, indicating that these infections are highly prevalent and difficult to control.<sup>3</sup> The description of a non-common, highly resistant strain makes this issue even more troubling. The strain described here is colistin-resistant, but none of the classical mutations responsible for this

phenomenon was detected. However, other mutations not yet described in the literature were identified (S363I in *pmrB*, L424P in *phoQ*, Q99R; Q239H; Q287; L295K in *crrB*). Although we did not do experiments to confirm the relationship of these mutations with resistance to colistin, this may be related to this phenotype. Another strain of *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* was recently described in Brazil, which although susceptible to colistin presented the KPC gene, reinforcing the idea that strains of this lineage are an important reservoir of resistance genes.<sup>6</sup> Unfortunately, the increased use of polymyxins has led to reports of colistin-resistant isolates worldwide, particularly in Brazil.<sup>3</sup> Although this strain does not have any carbapenemase gene, it is resistant to carbapenems, as well as to aminoglycosides (mediated by *aph(3')-Ia*, *ant(2'')-Ia* and *aadA2*), fluoroquinolones (mediated by *qnrA1*, *oqxA* and *oqxB*) and fosfomycin (mediated by *fosA*). In addition and more seriously, this strain presents the *bla<sub>CTXM-9</sub>* gene, conferring an ESBL phenotype.

To the best of our knowledge, this is the first report of a highly virulent and hypermucoviscous colistin-resistant *K. quasipneumoniae*, which may represent a new challenge for clinical management and public health concern in Brazil. The description of this strain sets up a dark storm in hospital settings, due to the real possibility of a new resistance and virulence genes reservoir, which represents a challenge for the development of more effective surveillance and prevention programs.

### Nucleotide sequence accession number

The sequence of the KP121 strain was deposited in GenBank with accession number QXXP00000000.

### Ethical approval

Not required.

### Funding

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

### Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.



---

## Acknowledgements

The authors wish to thank members of Laboratory of Bacterial Resistance and Therapeutic Alternatives, Department of Microbiology – ICBII/USP, especially Dr Nilton Licopan and members of Laboratory of Bacteriology in Fish, especially Dr Ulisses de Pádua Pereira, for assisting in the analysis of sequencing.

---

## REFERENCES

1. Gu D, Dong N, Zheng Z, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:37–46.
2. Long SW, Linson SE, Ojeda Saavedra M, et al. Whole-genome sequencing of human clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates reveals misidentification and misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. *mSphere*. 2017;2:290–317.
3. Ferreira ML, Araújo BF, Gonçalves IR, et al. Association of colistin-resistant KPC clonal strains with subsequent infections and colonization and biofilm production. *Microb Drug Resist*. 2018 [Epub ahead of print].
4. Liang Q, Yin Z, Zhao Y, et al. Sequencing and comparative genomics analysis of the IncHI2 plasmids pT5282-*mphA* and p112298-*catA* and the IncHI5 plasmid pYNKP001-*dfrA*. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49:709–18.
5. Catalan-Najera JC, Garza-Ramos U, Barrios-Camacho H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? *Virulence*. 2017;8:1111–23.
6. Nicolás MF, Ramos PIP, Marques de Carvalho F, et al. Comparative genomic analysis of a clinical isolate of *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, a KPC-2 and OKP-B-6 beta-lactamases producer harboring two drug-resistance plasmids from Southeast Brazil. *Front Microbiol*. 2018;9:220.