



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas - IB

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana - PPGBM

Caracterização biológica de isolados clínicos de *Klebsiella spp* do Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB) durante o período de junho de 2014 a dezembro de 2016.

Aluna: Ana Paula Cardoso

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Amabile de Campos

Brasília, Fevereiro de 2019

Ana Paula Cardoso Almeida

**Caracterização biológica de isolados clínicos de *Klebsiella spp* do
Hospital Universitário de Brasília – HUB/UnB**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Microbiana para
a obtenção do título de Mestre em Biologia
Microbiana.

Orientadora: Tatiana Amabile de Campos

Brasília-DF

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Caracterização biológica de isolados clínicos de *Klebsiella spp* do Hospital Universitário de Brasília – HUB/UnB

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana para a obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

Ana Paula Cardoso Almeida

Dissertação aprovada em:

Comissão examinadora:

1º Membro (Presidente):

Prof. Dra. Tatiana Amabile de Campos (UnB)

2º Membro:

Prof. Dr. André Pitondo da Silva (UNAERP)

3ºMembro:

Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins (UnB)

4ºMembro (Suplente):

Prof. Dra. Carla Nunes Araújo (UnB)

Dedicatória:

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

Dedico aos meus pais e minha irmã, por serem meu maior apoio e incentivo em tudo o que fiz na vida, por serem responsáveis por tudo o que sou. Aos amigos que me apoiaram e incentivaram durante esse projeto.

Agradecimentos

A Deus por me abençoar, proteger sempre e em especial, durante esse trabalho.

Aos meus pais por sempre me apoiarem e por toda a dedicação dada a mim durante os anos, não chegaria aonde estou e nem seria o quem sou sem vocês. Obrigada pelo cuidado e carinho, e pela preocupação de sempre estarem presentes, por todo o amor, paciência e doação. A minha irmã por todos os momentos e aprendizados compartilhados. Obrigada por serem família, minha segurança e certeza na vida.

A professora Dra. Tatiana, por ter sido muito mais do que orientadora, a mãe que a UnB me deu. Por me acalmar e estar presente sempre. Obrigada por influenciar tão positivamente em meu crescimento pessoal e profissional, e por dividir seus conhecimentos de forma carinhosa e atenciosa. Ao professor Dr. Vicente, por todo suporte, risadas e conhecimentos oferecidos. Trabalhar com vocês sem dúvida deixou tudo mais tranquilo e agradável. Obrigada pelo acolhimento nesses anos. Ao Dr. André Pitondo, pela parceria e colaboração em todo esse trabalho. A banca da qualificação, pelas sugestões e conselhos na dissertação. A banca da qualificação, pelas sugestões e conselhos na dissertação da qualificação.

Aos amigos que compartilharam dessa caminhada comigo. A Nayara, obrigada por sempre me ajudar quando precisei, pela sinceridade, e pelo companheirismo em todas

as aulas. A Letícia, pelo carinho e leveza com que me tratava deixando o convívio no laboratório mais alegre. A Rafa, obrigada pela ajuda com os experimentos e por toda a atenção. A Isa, muito obrigada pela paciência, por ter me acompanhado e ajudado durante todo o processo, pelas muitas risadas compartilhadas e por toda a confiança. A minha melhor amiga Laura, obrigada por sempre estar presente, por me ajudar, me acalmar nos momentos complicados, por compartilhar seus conhecimentos, por dividir comigo momentos e histórias de uma vida inteira e por todo o amor e carinho. Aos amigos Paulo e Luanna, por todos os momentos de alegrias e desabafos, obrigada pela paciência e cuidado comigo nesses anos de amizade. Aos colegas do LAMP, obrigada pela colaboração e assistência em todos os momentos que precisei.

Aos colegas de outros laboratórios, obrigada pela paciência e solicitude, especialmente a Aline do laboratório da Cynthia, a Gabriela do LIM1 e ao Agnelo e do Labiogene.

As organizações de fomento CAPES, FAPDF, FAHUB, pelo auxílio financeiro para a execução desse projeto.

Resumo

As espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella variicola* são uma das mais relacionadas com infecções no trato urinário (UTI's), pulmonares, sanguíneas e septicemias. Além da patogenicidade inerente a ambos microrganismos, e de primariamente infectarem pacientes imunocomprometidos o surgimento de linhagens resistentes (R) e multirresistentes (MDR), com fenótipo hiper mucoso (hmKP) e linhagens hipervirulentas com capacidade de infectar pacientes saudáveis, têm dificultado o tratamento terapêutico dos pacientes. Soma-se a isso o fato de isolados clínicos de *K. variicola* terem sido identificados equivocadamente como *K. pneumoniae* devido a similaridade genética e fenotípica entre elas, dificultando ainda mais a intervenção e sucesso terapêutico em pacientes afetados por essa linhagem. Assim, a identificação precisa, a caracterização biológica e epidemiológica permite diferenciar e compreender os mecanismos de patogenicidade, especificamente associados com cada espécie. O objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização biológica de *Klebsiella spp* isoladas pelo Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Universitário de Brasília (HUB) durante o período de setembro de 2013 a janeiro de 2017. Nossos resultados expõem que tanto os isolados de *K. pneumoniae* e *K. variicola* apresentam mecanismos de virulência que evidenciam sua patogenicidade. Como a sobrevivência e crescimento em sangue e soro humano após 30 minutos de infecção; a produção de biofilme forte ou moderada em superfície abiótica conferindo aos isolados maior resistência à antimicrobianos. Além de apresentarem perfis de resistência ou multirresistência sendo a maioria dos isolados originados externamente ao hospital indicando que os isolados vêm da comunidade, e utilizam seus hospedeiros como reservatórios. Além disso, os isolados apresentaram características genotípicas que os caracterizam como linhagens hmKP

(hipermucoviscosas), uma vez que a expressão de cápsula nessas linhagens é maior, devido à presença do gene regulador *rmpA*. Porém, em alguns de nossos isolados de *K. pneumoniae* não foi detectada a presença do gene *rmpA*, sugerindo a presença de outro(s) gene(s) responsável pelo fenótipo. Foram encontrados isolados de *K. pneumoniae* isolados com o tipo capsular K1, altamente associados com linhagens hipervirulentas capazes de acometer também pacientes saudáveis. Observamos também, que os mecanismos e fatores de *K. pneumoniae* estudados nesse trabalho não foram associados a um único clone, sugerindo que linhagens de *K. pneumoniae* com um elevado potencial patogênico estão amplamente disseminadas pelo ambiente hospitalar e pela comunidade de Brasília-DF. Ainda, as linhagens de *K. variicola* têm a capacidade de infectar e sobreviver em células epiteliais HEp-2, embora não sejam citotóxicas para elas, podendo ser um outro mecanismo utilizado pelo patógeno para evadir com êxito o sistema imune do hospedeiro. Por fim nossos resultados exibem um cenário preocupante, uma vez que isolados de *K. pneumoniae* e *K. variicola* apresentam mecanismos de virulência que os tornam mais patogênicos.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, patogenicidade, hipervirulência, hipermucoíde, epidemiologia.

Abstract

Klebsiella spp is one of the genera of the Enterobacteriaceae family most associated with community-acquired nosocomial infections, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola* being the most commonly associated with infections of the urinary tract (UTI's), pulmonary, blood and septicemia. In addition to the pathogenicity inherent in both microorganisms, and primarily to infect immunocompromised patients, the emergence of resistant (R) and multiresistant (MDR) lineages with hypermucosal phenotype (hmKP) and hypervirulent strains capable of infecting healthy patients and spreading metastatically, being to date identified in species of *K. pneumoniae*; have hindered the therapeutic treatment of patients. In addition, clinical isolates of *K. variicola* were mistakenly identified as *K. pneumoniae* due to genetic and phenotypic similarity between them, further hindering intervention and therapeutic success in patients affected by this strain. Thus, the correct identification of these strains, the biological characterization of their virulence mechanisms and factors, and the epidemiological characterization make it possible to differentiate and understand them, and these peculiarities may be associated with the severity of the pathologies caused by them. Therefore, the objective of this work is to perform the biological characterization of *Klebsiella spp* isolated by the Hospital Universitário de Brasília (HUB) during the period from September 2013 to January 2017. Our results show that both isolates *K. pneumoniae* and *K. variicola* present virulence mechanisms that demonstrate the pathogenicity of the isolates, such as survival and growth in blood and human serum after 30 minutes of infection; the production of a strong or moderate biofilm on the abiotic surface, giving the isolates a greater resistance to the

action of antimicrobials besides presenting profiles of resistance or multiresistance being the majority of the isolates originated outside the hospital indicating that the isolates came from the community, and use their hosts as reservoirs. In addition, the isolates presented genotypic characteristics that characterize them as hmKP strains, since the capsule expression in these strains is greater, due to the presence of the regulator gene *rmpA* already described in the literature, but in some of our isolates of *K. pneumoniae* although presented the phenotype, the presence of the *rmpA* gene was not detected in them, suggesting the presence of another gene (s) responsible for the phenotype. We obtained in our collection of *K. pneumoniae* isolated with K1 capsular type, highly associated with hypervirulent strains capable of infect healthy patients. We also observed that the mechanisms and factors of *K. pneumoniae* studied in this study were not associated with a single clone, suggesting that *K. pneumoniae* strains with a high pathogenic potential are widely disseminated in the hospital environment and in the Brasília-DF community. Furthermore, *K. variicola* strains have the ability to infect and survive in HEp-2 epithelial cells, although they are not cytotoxic to them, and may be another mechanism used by the pathogen to successfully evade the immune system of the host. Finally, our results show a worrying scenario, since isolates of *K. pneumoniae* and *K. variicola* present virulence mechanisms that make them more pathogenic, in addition to *K. variicola* strains have been erroneously identified, impairing the correct and effective treatment, these strains have been increasingly associated with nosocomial infections and have a higher virulence than those isolated from *K. pneumoniae*.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, pathogenicity, hypervirulence, hypermucoid, epidemiology.

Lista de Figuras

Figura 1. Semelhanças e diferenças entre linhagens de <i>Klebsiella pneumoniae</i> hipervirulentas e hiper mucoviscosas.....	24
Figura 2. Fatores de virulência em cepas clássicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (cKP) e cepas hipervirulentas (hvKP).....	25
Figura 3. Papel da cápsula como fator de virulência em linhagens de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	26
Figura 4. Estrutura do LPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Figura adaptada de Paczosa, 2016.....	27
Figura 5. Funções das fimbrias do tipo I e III durante a infecção e formação de biofilme por <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Figura adaptada de Paczosa, 2016.....	30
Figura 6. Tipos de sideróforos presentes em linhagens de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
Figura 7. Representação do fenótipo hiper mucóide em <i>Klebsiella pneumoniae</i> e como é executado o ensaio de “string test”.....	40

Figura 8.	Origem dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> do Hospital Universitário de Brasília.....	46
Figura 9.	Perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	48
Figura 10.	Porcentagem de resistência dos isolados MDR de acordo com a classe de antibióticos analisadas no antibiograma.....	49
Figura 11.	Proporção de linhagens de <i>Klebsiella pneumoniae hmKP</i>	50
Figura 12.	Caracterização da produção de biofilme.....	51
Figura 13.	Sobrevivência dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em sangue humano.....	51
Figura 14.	Sobrevivência dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em soro humano	52
Figura 15.	Representação da eletroforese em gel de agarose (1% v/v) para verificar a presença dos genes produtores do fenótipo de hiper mucoviscosidade <i>magA</i> e <i>rmpA</i> .	53
Figura 16.	Eletroforese em gel de agarose 1% contendo a amplificação dos genes <i>wzy</i> e <i>wzx</i> específicos para o sorotipo K1.....	56
Figura 17.	Dendrograma representativo de similaridade genética dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	59
Figura 18.	Sobrevivência de isolados de <i>Klebsiella variicola</i>	62
Figura 19.	Determinação da sobrevivência de isolados de <i>K. variicola</i> em células epiteliais HEP-2.....	63
Figura 20.	Viabilidade células epiteliais (Hep-2) após os tempos de 24, 6, 3 horas de infecção.....	65
Figura 21.	Dendrograma de similaridade genética entre os isolados de <i>Klebsiella variicola</i>	66

Lista de Tabelas

Tabela 1 Modelo utilizado para a classificação de produção de biofilme de acordo com a média aritmética obtida da triplicata da absorbância atingida na leitura do teste. VA: valor de absorbância obtido da amostra. CN: valor de absorbância do controle negativo.	40
Tabela 2 Número de isolados MDR resistentes às classes de antibióticos testados no antibiograma.....	49
Tabela 3 Cultura de origem e produção de biofilme dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> hmKP que não apresentaram os genes <i>magA</i> e <i>rpmA</i>	55
Tabela 4 Produção de biofilme e de fenótipo hmKP dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> portadores de <i>magA</i> e/ou <i>rpmA</i>	56
Tabela 5 Caracterização microbiológica e genético de todos os isolados com o gene <i>K1</i> , altamente associado com hipervirulência em <i>K. pneumoniae</i> . Caracterização quanto à	

resistência a antimicrobianos, hiper mucoviscosidade, produção de biofilme e presença dos genes <i>magA</i> e <i>rmpA</i>	58
Tabela 6 Caracterização microbiológica e genética de todos os isolados de <i>K. pneumoniae</i> que apresentaram multirresistência (MDR), quanto a produção de biofilme, hiper mucoviscosidade e presença dos genes <i>magA</i> e <i>rmpA</i>	62
Tabela 7 Caracterização dos isolados de <i>Klebsiella variicola</i> de acordo com a origem, perfil de resistência a antimicrobianos, fenótipo HMV, produção de biofilme, presença dos genes <i>magA</i> e <i>rmpA</i> , e sorotipo K1.	63

Abreviaturas

BLSEs: beta-lactamases de espectro estendido

CFU: Unidade Formadora de Colônia

cKp: *K. pneumoniae* clássica

cKp-MDR: *K.pneumoniae* clássicas multirresistentes

HmKP- *Klebsiella pneumoniae* hiper mucoviscosa/hipermucoíde

ERIC :Sequencias Consensus Repetitivas de Enterobactérias

HvKp: *K. pneumoniae* hipervirulentas

ITUs: infecções do trato urinário

KPCs: beta lactamase do tipo carbapenamase

LPS: Lipopolissacarídeo

MDR: multirresistentes

PFGE: Pulse Field Gel electrophoresis

MOI: Multiplicidade de infecção

MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

PBS: Salina tamponada com fosfato

UTIs: unidades de terapia intensiva

i. Introdução

Gênero *Klebsiella* spp.

O gênero *Klebsiella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e integra-se de patógenos oportunistas geralmente encapsulados em forma de bacilos Gram negativos, não móveis com aspecto mucoide (PODSCHUN; ULLMANN, 1998, GARZA-RAMOS et al., 2015). É um dos gêneros mais associados com infecções hospitalares (nosocomiais) e são patógenos oportunistas, infectando principalmente pacientes imunocomprometidos com doenças subjacentes como *Diabetes Melitus* ou com obstrução pulmonar, e podem causar doenças graves como septicemia, pneumonia e infecções do trato urinário. (GARZA-RAMOS et al., 2015)

Klebsiella spp. é considerado ubíquo quanto às suas associações de habitat, visto que é encontrado abundantemente na natureza, incluindo plantas e animais (BAGLEY, 1985; PACZOSA; MECSAS, 2016]). Faz parte da microbiota residente ou transitória de animais (mamíferos e aves) e humanos especialmente do trato gastrointestinal (BAGLEY, 1985). Nesse aspecto, os micro-organismos do gênero são similares a *Enterobacter* e *Citrobacter*, contrariamente a *Escherichia coli* que são abundante encontradas em humanos, mas não no meio ambiente (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

Klebsiella é um gênero com uma grande variedade de espécies, até o momento 19 espécies foram descritas (Straininfo.net, 2019) das quais, as linhagens de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* são as mais expressivas clinicamente (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). As espécies do gênero, são geralmente identificadas e diferenciadas de acordo com suas reações bioquímicas e material genético. Dentre as espécies, os micro-organismos da espécie *K. pneumoniae* são os mais associados com infecções hospitalares e, por esta razão apresenta grande relevância clínica. Nos últimos anos, linhagens da espécie *K. variicola*, que apresenta elevada similaridade genética à *K. pneumoniae*, também foram associadas às infecções hospitalares (POTTER et al., 2018).

Klebsiella pneumoniae

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* foi descrita pela primeira vez por Carl Friedlander, no final do século 19. Essa bactéria foi isolada dos pulmões de pacientes que morreram de pneumonia, e foi nomeada a princípio como bactéria de Friedlander (HOLT et al., 2018). É um patógeno oportunista comumente encontrado em humanos e animais, uma vez que faz parte da microbiota residente ou transitória especialmente do trato gastrointestinal (BAGLEY, 1985).

K. pneumoniae é um bacilo encapsulado Gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, e que fermenta lactose (FANG et al., 2004; PODSCHUN; ULLMANN, 1998). É considerado um dos patógenos oportunistas mais pertinentes, devido às várias infecções humanas que causam tais como infecções sanguíneas, infecções no trato urinário (UTI), pneumonia, infecções pós-operatórias, abscessos hepáticos piogênicos e meningite (PACZOSA; MECSAS, 2016; XU; SUN; MA, 2017). *K. pneumoniae* é o organismo dentro do gênero mais associado a infecções em indivíduos hospitalizados, e portanto o mais clinicamente estudado (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

Uma vez adquirida, *K. pneumoniae* coloniza facilmente as mucosas humanas incluindo orofaringe e o trato gastrointestinal (HOLT et al., 2018; PACZOSA; MECSAS, 2016). Esse micro-organismo é encontrado na pele, porém, não a coloniza assim é considerado microbiota transiente nesse sítio (KLOOS; MUSSELWHITE, 1975). As taxas de colonização variam de acordo com o local do corpo e se a bactéria foi adquirida na comunidade ou no hospital (HOLT et al., 2018). Quando se trata de colonização adquirida na comunidade na nasofaringe o percentual é maior em adultos do que em crianças (HOLT et al., 2018; WOLF et al., 2001). *K. pneumoniae* coloniza o trato gastrointestinal, sendo que em ambientes hospitalares essa taxa é maior, devido provavelmente a utilização de antibióticos (FILIUS et al., 2005; RAFII; SUTHERLAND; CERNIGLIA, 2008). Apesar da colonização nesses sítios ser benigna ao hospedeiro (BAGLEY, 1985; THOMAS et al., 2017), eles são a porta de entrada, para que a bactéria possa se evadir para outros tecidos e causar prováveis infecções graves (DORMAN; SHORT, 2017).

Como citado anteriormente, *K. pneumoniae* é um micro-organismo pertencente à microbiota residente do trato gastrointestinal do humano, esse é portanto um reservatório

importante para cepas que causam infecções relacionadas à saúde (DORMAN; SHORT, 2017; HOLT et al., 2018; PACZOSA; MECSAS, 2016). Quando se trata de colonização com infecções subsequentes, o trato gastrointestinal (TGI) mostrou-se o mais relacionado às infecções desse tipo (LI et al., 2014). Assim, o TGI pode ser um reservatório de *K. pneumoniae* resistentes aos antibióticos, principalmente em ambientes hospitalares. Desta forma, a colonização é um passo na progressão de infecções, embora os mecanismos associados a esta progressão não estejam totalmente esclarecidos, a conscientização se faz necessária a fim de evitar infecções futuras e para a elaboração de protocolos de intervenção (HOLT et al., 2018).

***Klebsiella pneumoniae* resistente aos antimicrobianos**

Apesar da similaridade no que se refere aos padrões bioquímicos, virulência e patogenicidade entre os isolados de *K. pneumoniae* ambientais e clínicos (HOLT et al., 2018; PODSCHUN; ULLMANN, 1996; STRUVE; KROGFELT, 2004), a susceptibilidade aos antimicrobianos é maior em isolados ambientais (PODSCHUN; ULLMANN, 1996), provavelmente devido à pressão seletiva do ambiente hospitalar (HOLT et al., 2018). A prevalência do patógeno no meio ambiente varia de acordo com a estação e clima do ano (ANDERSON et al., 2008). Em ambientes hospitalares, por outro lado, as fontes iminentes de transmissão são várias como por exemplo superfícies e instrumentos contaminados e o contato interpessoal (HOLT et al., 2018).

Nas últimas décadas, houve um aumento considerável na prevalência de linhagens de *K. pneumoniae* com resistência a uma ampla gama de antibióticos. Este cenário é bastante preocupante pois dificulta o tratamento de infecções simples como do trato urinário (UTIs), uma vez que antimicrobianos antes eficientes, atualmente não

apresentam mais efeito. Ademais, as infecções mais graves como pneumonias ou bacteremias tornaram-se mais ameaçadoras para a vida (KUEHN, 2013; MALEKI et al., 2018).

Dentre os tipos de resistência aos antibióticos, dois mecanismos têm sido frequentemente observados em *K. pneumoniae*: (i) resistência a antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro, principalmente veiculada em plasmídeos, tornando as células bacterianas resistentes aos beta lactâmicos de última geração como as cefalosporinas, por exemplo; e (ii) a expressão de carbapenemases, bactérias que possuem esse tipo de enzima do tipo BLSE (Beta lactamase de espectro estendido) são resistentes a quase todos os antibióticos existentes, até mesmo os carbapenêmicos. Esse tipo de linhagem é denominada de KPC (*Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase producing*) (IREDELL; BROWN; TAGG, 2016). Existem algumas carbapenemases descritas em *K. pneumoniae* além da KPC como NDM (*New-Delhi metallo- β -lactamase*), VIM (*Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*), IMP (*Imepenemase*). Essas carbapenemases são encontradas em outras bactérias, o que contribui para o aumento da incidência de bactérias resistentes à carbapenemicos mundialmente. Como existe uma limitação no tratamento de infecções com estirpes de *K. pneumoniae* resistentes tanto ao BLSEs e aos carbapenêmicos as taxas de morbidade e mortalidade são significativamente maiores quando comparadas a bactérias não resistentes (IREDELL; BROWN; TAGG, 2016; KUEHN, 2013; MALEKI et al., 2018).

A resistência à carbapenemicos em *K. pneumoniae* envolve muitos mecanismos. Essas enzimas são divididas em classes moleculares A, B ou D (AMBLER et al., 1980). As que pertencem a classe A foram quase todas relatadas em *K. pneumoniae*, como por exemplo a KPC-1, essas enzimas conferem à célula bacteriana resistência à carbapenêmicos, monobactâmicos, penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas são inibidas

pelos inibidores da β -lactamase. De forma fraca: ácido clavulânico e tazobactam; e ácido bórico e avibactam. As enzimas de classe B, também identificadas como MBL (metallo-lactamases) são essencialmente enzimas do tipo NDM, VIM, e IMP, bactérias com MBLs são frequentemente resistentes à penicilina, carbapenóides, cefamicinas e cefalosporinas, porém apresentam sensibilidade aos monobactâmicos. A atividade desse grupo de enzimas é inibida por quelantes de metais como EDTA e ácido dipicolínico. Existe uma única β -lactamase encontrada em *K. pneumoniae* até o momento, é a OXA-48 e seus derivados. De modo geral, o OXA-48 hidrolisa eficientemente os β -lactâmicos de espectro estreito, como as penicilinas, hidrolisa fracamente os carbapenêmicos e apresenta sensibilidade as cefalosporinas de amplo espectro (FUZI et al., 2016; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

Existem vários fatores que contribuem para o aumento da prevalência da resistência bacteriana, como, por exemplo, o uso inadequado de antibióticos na saúde humana e na produção pecuária, a falta de novas alternativas antimicrobianas, e a transferência genética horizontal que ocorre naturalmente entre os micro-organismos (IREDELL; BROWN; TAGG, 2016).

***Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta (hvKP)**

Acrescentando-se ao aumento da incidência de linhagens de *K. pneumoniae* resistentes à antibióticos; houve também um aumento na disseminação de uma nova variante de *K. pneumoniae*, nos últimos anos. Essa linhagem é considerada hipervirulenta (hvKP) pois pode causar infecções graves em indivíduos saudáveis assim como nos imunocomprometidos. Além de serem muito invasivas, a maioria das infecções causadas

por *hvKP* são oriundas da comunidade (SHON; BAJWA; RUSSO, 2013; STRUVE et al., 2015).

Embora a colonização seja necessária para a infecção, nem sempre um indivíduo colonizado por um patógeno será acometido com alguma infecção. Alguns estudos sugerem que, assim como as infecções oportunistas causadas pelas linhagens clássicas de *K. pneumoniae*, as infecções causadas por *hvKP* têm como patógeno a bactéria endógena. Portanto, muitos indivíduos podem ser colonizados com *hvKP* potencialmente mortais. Apesar dos dados sobre *hvKP* ainda serem restritos, acredita-se que os meios de aquisição de *hvKP* são os mesmos das *cKP* : água, transmissão pessoa a pessoa, alimentos, transmissão de animal pra pessoa, e ambiente hospitalar (SHON; BAJWA; RUSSO, 2013).

HvKP foi descrita pela primeira vez entre as décadas de 1980 e 1990 em Tawain, quando pacientes que não tinham histórico de doença hepatobiliar apresentaram abscessos hepáticos adquiridos na comunidade. Embora tenham sido primariamente reportados no continente asiático, e geralmente ocorrerem com mais frequência neste território, estudos epidemiológicos comprovam que essa nova variante de *K. pneumoniae* tem se espalhado mundialmente (LEE et al., 2017; STRUVE et al., 2015).

Essas cepas hipervirulentas são comumente associadas à abscessos hepáticos piogênicos, porém podem causar outros tipos de infecções como pneumonia e abscessos pulmonares. Embora a maioria das *hvKP* seja susceptível ao tratamento com quase todos os antibióticos, existem relatos de casos de *hvKP* resistentes à carbapenamases, o que potencializa o fator de risco, pois além da virulência inata dessa cepa, a resistência a antibióticos, faz com que o tratamento seja mais difícil e em alguns casos, fatais (SHON; BAJWA; RUSSO, 2013; STRUVE et al., 2015).

***Klebsiella pneumoniae* hipermucoíde (hmKP)**

São consideradas linhagens hipermucoviscosas de *K. pneumoniae*, aquelas bactérias que apresentaram um fenótipo característico de super expressão capsular observados pelo teste quantitativo “string test”. Existem dois genes responsáveis por esse fenótipo de acordo com a literatura: o *rmpA* é o regulador da produção de capsúlas e o *magA* está associado ao fenótipo. Vale salientar que erroneamente linhagens de *K. pneumoniae* hipervirulentas são confundidas com *K. pneumoniae* hipermucoviscosas (hmKP). Basicamente essas duas variantes possuem semelhanças e diferenças pontuais que as classificam em dois diferentes grupos, assim como existem linhagens que compartilham de características (Figura 1) de cada grupo as tornando potencialmente mais danosas à saúde do hospedeiro. Portanto uma bactéria pode conter características de linhagem hipermucoviscosa e não causar infecções metastáticas em pacientes saudáveis como ocorre com linhagens hipervirulentas de *K. pneumoniae*. (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017)

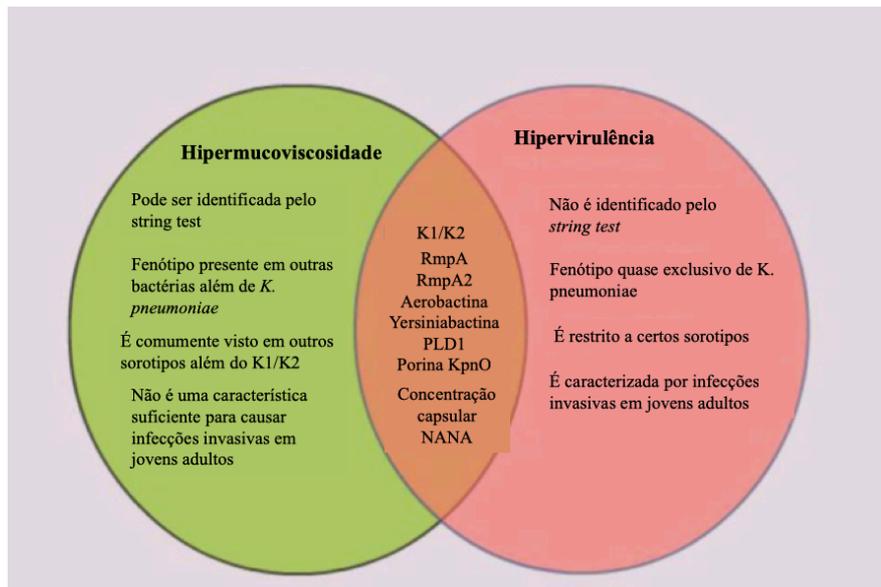


Figura 1 Semelhanças e diferenças entre linhagens de *Klebsiella pneumoniae* hipervirulentas e hipermucoviscosas. Figura adaptada de Catalán-Nájera et al 2017.

Fatores de virulência

Para que um micro-organismo possa causar infecção, é necessário que ele ultrapasse as barreiras mecânicas assim como a imunidade humoral e inata do hospedeiro (DORMAN; SHORT, 2017). *K. pneumoniae* clássica (*cKP*) e *K. pneumoniae* hipervirulenta (*hvKP*) utilizam várias estratégias para sobreviver e proteger-se da resposta imune do hospedeiro (GHARRAH; MOSTAFA EL-MAHDY; BARWA, 2017; INSUA et al., 2013). Existem 4 principais fatores de virulência associados à *K. pneumoniae*: cápsulas, lipopolissacarídeos (LPS), sideróforos, e fimbrias (Figura 2). Estes fatores desempenham diversas funções em variados tipos de infecções (PACZOSA; MECSAS, 2016).

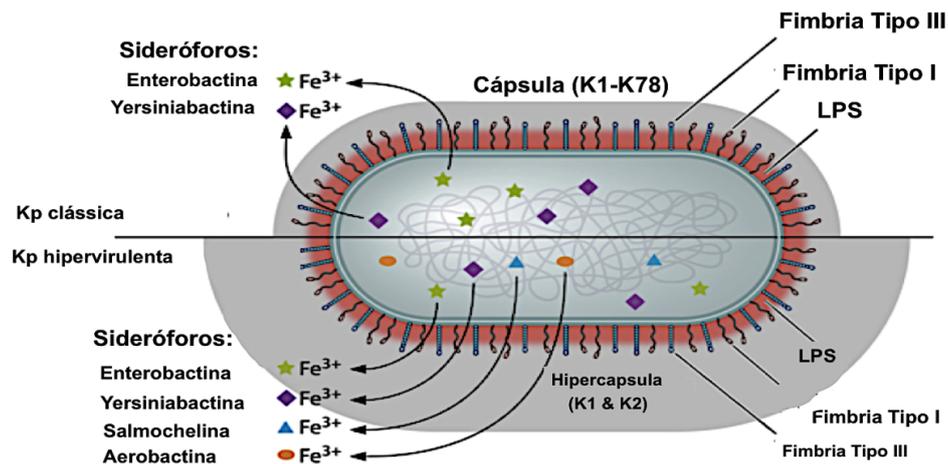


Figura 2 Fatores de virulência em cepas clássicas de *Klebsiella pneumoniae* (cKP) e cepas hipervirulentas (hvKP). Existem quatro principais fatores de virulência descritos em linhagens de *Klebsiella pneumoniae*: Cápsula, fimbrias, sideróforos e LPS. Figura adaptada de Pacsoza et al 2016

Cápsula

A cápsula é dentre os fatores de virulência, o mais estudado, pois confere à célula a capacidade de se disseminar sistematicamente no hospedeiro, além de protegê-la contra a fagocitose por células do sistema imune bloqueando a ligação e sua internalização. A cápsula também protege o micro-organismo da ação de peptídeos antimicrobianos derivados do hospedeiro e dos liberados por bactérias pertencentes à microbiota residente ou transiente (Figura 3) (CAMPOS et al., 2004; LI et al., 2014).

Além da sua função anti-fagocítica os polissacarídeos capsulares estão associados também à inibição da diferenciação e capacidade funcional dos macrófagos *in vitro* (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). É uma matriz de polissacarídeos capsulares característicos nomeados antígenos K, que têm uma alta diversidade entre as estirpes, variando de K1 até K78, sendo os antígenos K1 e K2 com maior incidência nas cepas

nosocomiais e virulentas (Figura 3)(BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014; PACZOSA; MECSAS,2016).

Os genes responsáveis pela síntese da cápsula nas cepas de *K. pneumoniae* estão localizados em um *operon* cromossômico denominado *cps* (capsular polysaccharide synthesis). Cada gene do *cluster* está associado a mecanismos e estruturas essenciais para síntese e manutenção da cápsula. Apesar da diversidade gênica deste *operon* na organização e na sequência, os genes responsáveis pela síntese capsular são altamente conservados (PAN et al., 2015; SHU et al., 2009; WYRES et al., 2016). Os antígenos do *cps* estão frequentemente associados ao desenvolvimento de infecções pulmonares causadas por *K. pneumoniae* (CORTÉS et al., 2002; LI et al., 2014).

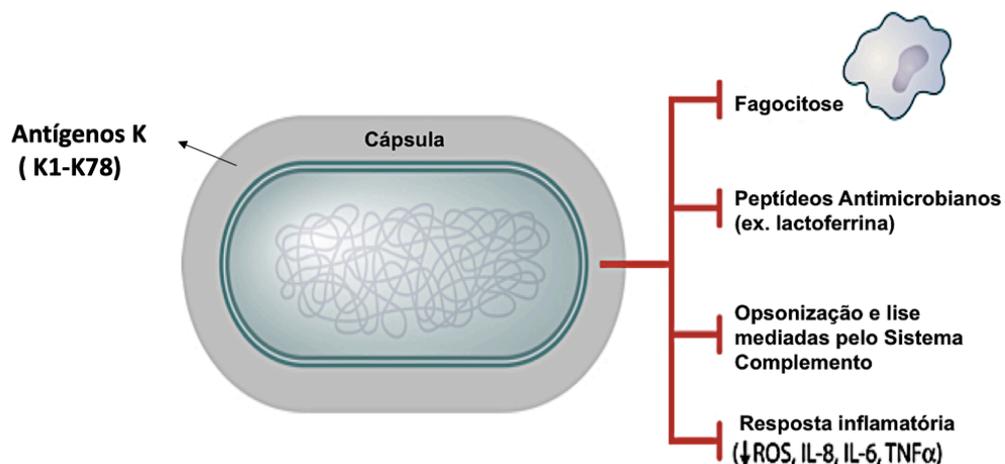


Figura 3 Papel da cápsula como fator de virulência em linhagens de *Klebsiella pneumoniae*. A capsula protege a célula bacteriana contra a fagocitose, peptídeos antimicrobianos, opsonização mediada pelo sistema complemento, assim como protege contra resposta inflamatória do hospedeiro. Figura adaptada de Paczosa et al 2016.

Lipopolissacarídeo (LPS)

O LPS (lipopolissacarídeo) é um endotoxina presente na membrana externa de toda bactéria Gram-negativa. É constituído basicamente por um polissacarídeo, o antígeno O (estrutura mais externa do LPS, e variável), um oligossacarídeo central e o lipídeo A. A porção lipídica conservada é altamente imunogênica, visto que liga-se fortemente ao receptor TRL4 desencadeando respostas inflamatórias no hospedeiro, e proporciona à célula resistência à fagocitose por macrófagos (Figura 4) (HSIEH et al., 2012; LI et al., 2014; MARCH et al., 2013). O LPS é um fator de virulência essencial, pois protege a bactéria do reconhecimento do sistema complemento, aumentando a resistência bacteriana contra o sistema imune do hospedeiro.

Diferentemente do antígeno K, o antígeno O apresenta uma variedade menor entre as linhagens de *K. pneumoniae* circulantes. Até o momento, os variantes do antígeno identificados são 9, sendo o antígeno O1 o mais prevalente clinicamente (CORTÉS et al., 2002; FANG et al., 2016; HSIEH et al., 2012; LI et al., 2014).

Bactérias que possuem o variante O1, apresentam maior resistência ao soro (HSIEH et al., 2012) e aos peptídeos antimicrobianos (HSIEH et al., 2012; MARCH et al., 2013; PACZOSA; MECSAS,2016). Assim como o cluster de síntese capsular (*cps*), os genes que codificam a síntese do LPS, localizados no locus gênico *wb* são conservados, apesar da variabilidade genética nos diferentes grupos de antígenos O (LI et al., 2014). Ambos os antígenos são essenciais tanto para o desenvolvimento de sepse e sobrevivência no sangue do hospedeiro (CORTÉS et al., 2002; HSIEH et al., 2012; LI et al., 2014).

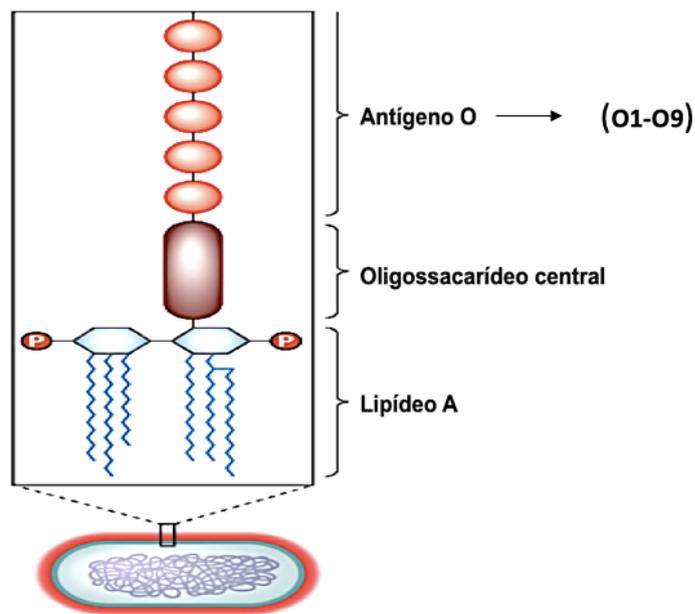


Figura 4 Estrutura do LPS de *Klebsiella pneumoniae*. Figura adaptada de Paczosa, 2016.

Fímbrias

Outro fator de virulência primordial de *K. pneumoniae* são as fímbrias (também conhecidas como pili) projeções proteicas não filamentosas na superfície bacteriana. São intermediários importantes no processo de adesão da célula em superfícies, já que o sucesso da infecção depende da proximidade da bactéria com a célula hospedeira (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). Em *K. pneumoniae*, as fímbrias do tipo I e III são as mais caracterizadas como fatores de patogenicidade (PACZOSA; MECSAS, 2016; PODSCHUN; ULLMANN, 1998). Existem outras estruturas adesivas que foram observadas na espécie, como a fímbria KPF-28, e o fator CF29K, que se assemelha a uma cápsula (DI MARTINO et al., 1996; LI et al., 2014).

O papel das fímbrias na patogenicidade da *K. pneumoniae* está na formação de biofilmes e na ligação à superfícies abióticas como cateteres. A formação de biofilme ocorre quando o micro-organismo em suspensão se adere a uma superfície e começa a

expressar uma matriz de exopolissacarídeos complexa (CHUNG, 2016; STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2008). Os biofilmes protegem a bactéria contra a opsonização por anticorpos, remoção pelo movimento ciliar das células epiteliais e da fagocitose. Os micro-organismos presentes no biofilme tornam-se muitas vezes resistentes a antimicrobianos os quais as células em suspensão são sensíveis (Figura 5). (COSTERTON; MONTANARO; ARCIOLA, 2005; SEIFI et al., 2016).

As fimbrias do tipo I são profusões finas e rígidas na superfície celular bacteriana, compostas basicamente por várias subunidades da proteína *FimA* e uma molécula de adesina *FimH* na extremidade (DI MARTINO et al., 1996; LI et al., 2014). Estas são as adesinas mais comuns, uma vez que são expressas na maioria dos isolados clínicos e ambientais tal como na grande maioria dos micro-organismos pertencentes ao género *Enterobacteriaceae*. Os genes desse tipo de fimbria são expressos no trato urinário, mas não no trato gastro intestinal ou pulmões (STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2008, PACZOSA; MECSAS, 2016). É por intermédio das fimbrias do tipo I que as bactérias colonizam tanto o trato urinário quanto o respiratório (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2008), contribuem para a invasão da bexiga e formação de biofilme na mesma, embora não tenha efeito sob a habilidade da *K. pneumoniae* de colonizar o intestino ou infectar o pulmão (LI et al., 2014; STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2008). A adesão no hospedeiro ocorre em estruturas que possuem manose, ou em matrizes extracelulares mediada pela adesina *FimH* (ROSEN et al., 2008). Apesar da importância clara do *pilus* I na fase inicial da infecção, sua contribuição para os passos subsequentes na infecção não são bem compreendidos até o momento (PODSCHUN; ULLMANN, 1998) (Figura 5).

As fimbrias do tipo III são anexos semelhantes a uma hélice, e diferentemente das do tipo I, essas são insensíveis à manose e portanto não se aderem a superfícies que a

contêm. As cepas de *K. pneumoniae* que expressam esse tipo de pili, aderem-se a várias células humanas como as epiteliais, uroepiteliais, renais e as do sistema respiratório. As fimbrias do tipo III são estritamente relacionadas com a formação de biofilme em cateteres (PACZOSA; MECSAS, 2016). Assim, acredita-se que esse tipo de fimbria pode contribuir para a ocorrência de infecções uropatogênicas (ROSEN et al., 2008). Sabe-se que ambas as fimbrias atuam de forma compensadora quando há uma super expressão de biofilme. A influência deste pili na patogenicidade da *K. pneumoniae* ainda é incerto (LI et al., 2014; PACZOSA; MECSAS, 2016; PODSCHUN; ULLMANN, 1988). Assim como seus homólogos, as fimbrias do tipo III não são necessárias para a colonização do trato gastro intestinal nem para a virulência no pulmão (LI et al., 2014; STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2009) (Figura 5).

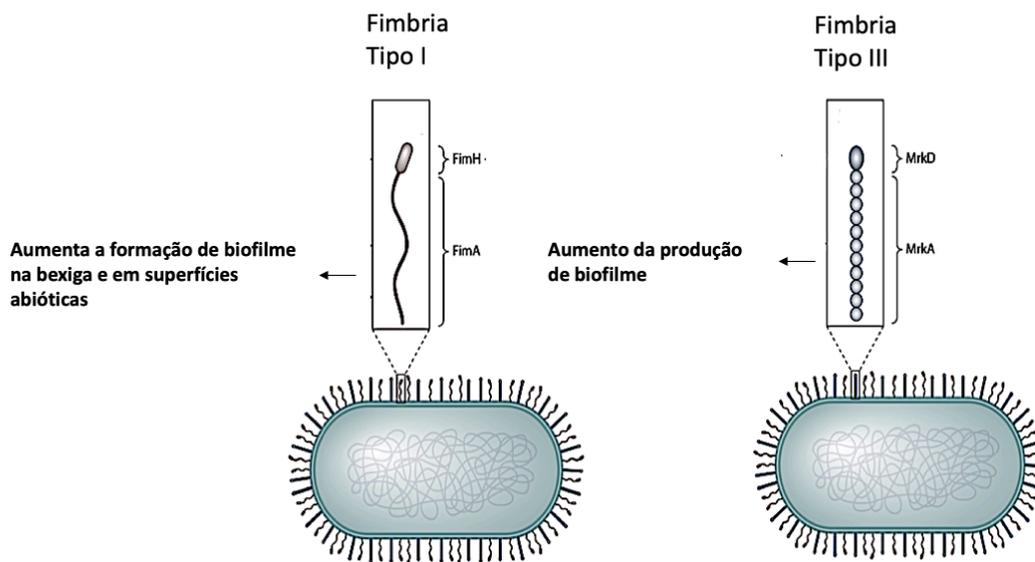


Figura 5 Funções das fimbrias do tipo I e III durante a infecção e formação de biofilme por *Klebsiella pneumoniae*. Figura adaptada de Paczosa, 2016.

Sideróforos

O ferro é essencial para que a célula bacteriana tenha sucesso na infecção, pois funciona como um catalisador de proteínas que participam no transporte de oxigênio e de elétrons (CLEGG; MURPHY, 2016). Portanto a bactéria deve adquiri-lo do meio ambiente. O ferro é um metal limitado no hospedeiro, já que como parte da resposta imune inespecífica o hospedeiro sequestra-o afim de limitar o crescimento do patógeno. Além disto, o ferro biodisponível no sangue está em concentrações baixas, visto que ele se liga a moléculas transportadoras como transferina e ferritina. Conseqüentemente, assim como outros patógenos bacterianos, *K. pneumoniae* utiliza-se de recursos para adquirir ferro do hospedeiro afim de sobreviver e se propagar durante a infecção (LI et al., 2014; PACZOSA; MECSAS,2016; PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

Para obter o ferro, *K. pneumoniae* e outros patógenos utilizam moléculas chamadas de sideróforos que possuem maior afinidade com o ferro do que as proteínas de transporte do hospedeiro captando, assim o ferro associado às proteínas. Existem mais de um tipo de sideróforo expresso pela *K. pneumoniae* tanto a taxa de expressão quanto a contribuição para a virulência da bactéria variam. Os sideróforos mais expressos por essa bactéria são enterobactina, salmochelina, yersiniabactina e aerobactina.

A expressão de enterobactina é a maior e mais presente nas cepas de *K. pneumoniae*, provavelmente por apresentar uma maior afinidade com o ferro em comparação com os outros quelantes de ferro conhecidos. Como resposta imune, os mamíferos evoluíram e passaram a secretar lipocalina 2, que sequestram a enterobactina, impedindo assim, a aquisição de ferro pelo sideróforo. (LI et al., 2014; PACZOSA; MECSAS,2016; PODSCHUN; ULLMANN, 1998) (Figura 6).

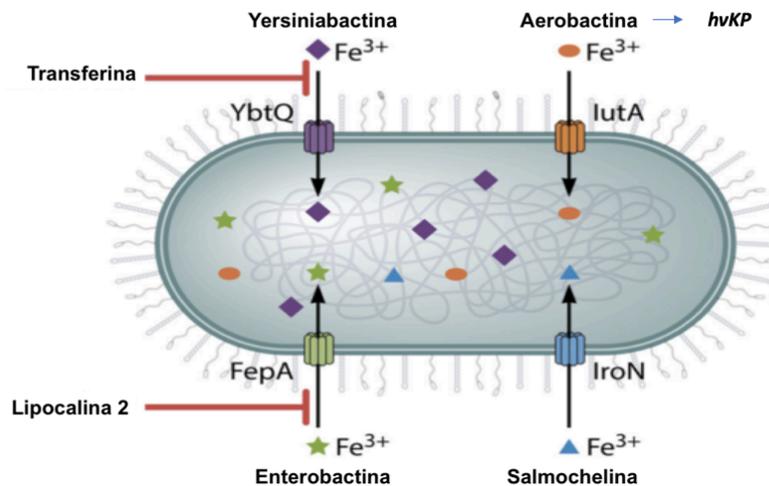


Figura 6 Tipos de sideróforos presentes em linhagens de *Klebsiella pneumoniae*. A enterobactina é o sideróforo primário usado por *K. pneumoniae*, embora seja inibida pela molécula hospedeira lipocalina-2. A salmochelina é uma forma de enterobactina c-glicosilada que não pode mais ser inibida pela lipocalina-2. A yersiniabactina e a aerobactina são estruturalmente distintas da enterobactina e da salmochelina. Figura adaptada de Paczosa et al., 2016

Fatores de virulência- *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta (hvKP)

O aspecto mais relevante dos isolados de *hvKP* é sua capacidade de causar infecções graves em pacientes saudáveis. Essa capacidade é atribuída a um plasmídeo presente nessa cepa, que confere à bactéria genes que codificam uma hiperprodução de cápsula (Figura 1). *HvKP* tem um fenótipo hiper mucoviscoso. Existem dois genes responsáveis por esse fenótipo de acordo com a literatura: o *rmpA* é o regulador da produção de cápsulas e o *magA* está associado ao fenótipo. Os tipos K1 e K2 de cápsulas estão fortemente associados com *hvKP*. O tipo capsular pode desempenhar um papel mais importante na virulência do que os genes *rmpA* e *magA* (PACZOSA; MECSAS, 2016; YEH et al., 2007).

Esse plasmídeo também codifica genes de aquisição de ferro (aerobactina e shalmoceлина) e não está presente na maioria das *cKP*. Assim como as *cKP* as *hvKP* esses fatores de virulência somados fazem a bactérias ser altamente virulenta para o humano. O LPS também foi encontrado na cepa controle de *hvKP* NTUH 2044, o que conferiu maior resistência bacteriana ao sistema complemento do hospedeiro, porém ainda não se sabe de que forma o LPS contribui para a virulência de cepas *hvKP*. Observou-se que *hvKP* produz mais biofilme do que isolados de *cKP*, o que pode contribuir para sua maior virulência (LEE et al., 2017; PACZOSA; MECSAS, 2016; SHON; BAJWA; RUSSO, 2013).

Apesar da maioria dos indivíduos com infecções causadas por *hvKP* serem jovens, saudáveis e sem registros de doenças pregressas como diabetes a taxa de mortalidade e morbidade é significativamente alta devido ao comportamento invasivo dessas linhagens (SHON; BAJWA; RUSSO, 2013). E em muitos casos em que o paciente não vem a óbito, a infecção por *hvKP* deixam sequelas irreparáveis (CHENG et al., 2012; FANG et al., 2007; SHON; BAJWA; RUSSO, 2013)

***Klebsiella variicola* (K.v)**

Klebsiella variicola foi de certo modo recentemente descrita (ROSENBLUETH et al., 2004) e está intimamente associada com *K. pneumoniae*, tanto que muitos isolados de *K. variicola* foram erroneamente identificados como *K. pneumoniae* (GARZARAMOS et al., 2015). E portanto sua patogenicidade e interação parasita- hospedeiro são pouco descritos.

A espécie foi identificada com base em sua análise filogenética de seis genes *housekeeping* (*rpoB*, *gyrA*, *nifH*, *infB*, *phoE* e *mdh*) além de hibridizações DNA-DNA.

Os patógenos dessa espécie são comumente isolados de fontes agrícolas, tais como plantas, solo e existem muitos registros de infecções em humanos, principalmente nosocomiais, além de isolados resistentes à antimicrobianos (MAATALLAH et al., 2014; MARTÍNEZ-ROMERO et al., 2018; POTTER et al., 2018)

A ausência de *kits* de identificação microbiológica e de ferramentas moleculares para diferenciar estas espécies bacterianas pode ser refletida na identificação errônea entre patógenos dificultando ainda mais o tratamento de pacientes infectados por eles uma vez que por se tratarem de micro organismos distintos devem ser tratados de forma exclusiva (POTTER et al., 2018; ROSENBLUETH et al., 2004).

Ferramentas moleculares para estudos epidemiológicos de *Klebsiella spp*

Uma variedade de técnicas de genotipagem são utilizadas para identificar e caracterizar linhagens de *Klebsiella spp* ,(HAN et al., 2013). Por meio da determinação do perfil de similaridade genética entre isolados bacterianos, estas técnicas têm grande aplicabilidade nas análises epidemiológicas e, por esta razão, são denominadas de técnicas de epidemiologia molecular (GORERING, 2010).

O perfil de macro-restrição por eletroforese em gel de campo pulsado (ou *Pulsed Field Gel Electroforesis* -PFGE) é considerada a técnica “padrão ouro” para estudos de epidemiologia molecular, não apenas para o gênero *Klebsiella*, mas também para enterobactérias e outras Gram-negativas (GOERING, 2010). A técnica consiste na separação de fragmentos de DNA genômico após digestão com enzimas de restrição. Os fragmentos são aplicados a uma matriz de gel e submetidos à eletroforese sob campo elétrico que se altera regularmente de direção. É uma variação da eletroforese convencional em gel de agarose e permite a análise de fragmentos de DNA bacteriano em uma ordem de grandeza maior do que com a análise convencional de enzimas de restrição. O PFGE fornece uma boa representação de

todo o genoma bacteriano em um único gel (BATU et al., 2017) Apesar disso, é uma técnica de difícil padronização, que demanda tempo relativamente elevado e é dispendiosa. (ASHAYERI-PANAH et al., 2013).

A amplificação de sequências ERIC por PCR ou ERIC-PCR (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus*-PCR ou amplificação de sequências intergênicas repetitivas de enterobactérias) é uma técnica baseada na amplificação de unidades repetitivas intergênicas (ERIC), que estão distribuídas de forma aleatória no genoma de enterobactérias. Uma vez que a frequência de sequências ERIC no genoma é diferente entre as linhagens bacterianas, esse método produz padrões diferentes de amplificação gerados pela região de anelamento dos *primers*. Os oligos iniciadores de amplificação apresentam sequências que os permitem ligarem-se às sequências repetidas e, conseqüentemente, para amplificar a distância entre os primers anexados a essas sequências (AFKHAMI ARDAKANI; RANJBAR, 2016) Por ser um método de fácil execução e rápido, ele se torna adequado para a epidemiologia hospitalar, uma vez que o número de microrganismos relacionados ao ambiente nosocomial é progressivamente crescente (BAKHSI; AFSHARI; FALLAH, 2018).

Justificativa

Espécies pertencentes ao gênero *Klebsiella* são frequentemente relacionadas às infecções oportunistas principalmente em ambientes nosocomiais. Entre elas, a espécie *K. pneumoniae* é considerada a de maior relevância clínica por ser a mais comumente associadas às infecções humanas. A elevada prevalência de linhagens resistentes e multirresistentes aos antimicrobianos as tornam clinicamente mais graves. Além disto, a identificação de linhagens com elevado potencial virulento e hipervirulento intensifica ainda mais sua relevância clínica.

Paralelamente, a crescente identificação da espécie *K. variicola* entre isolados clínicos inicialmente identificados como *K. pneumoniae* apontam para o surgimento de um novo patógeno humano do gênero *Klebsiella*.

Assim, a caracterização biológica de isolados clínicos de *Klebsiella* permite identificar espécies geneticamente similares e identificar linhagens de elevado potencial patogênico. Estes estudos agregação conhecimentos a patogênese associadas às espécies do gênero, possibilitando futuramente o estabelecimento de práticas clínicas para o tratamento das infecções causadas por *Klebsiella*.

Objetivos

Objetivo

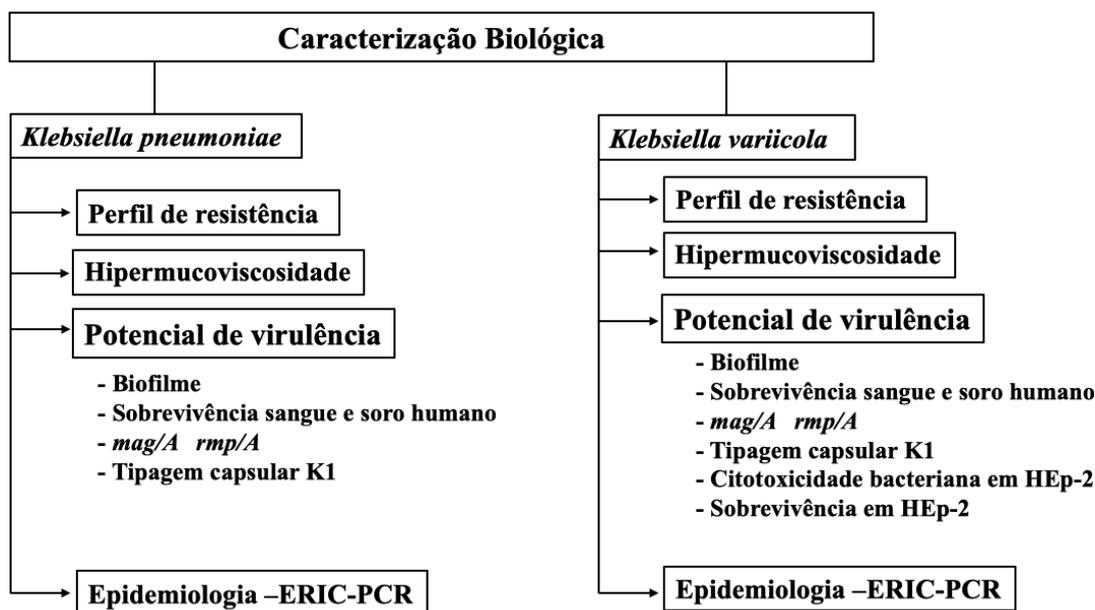
Realizar a caracterização biológica de 97 isolados de *Klebsiella spp* pelo Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Universitário de Brasília (HUB) durante o período de setembro de 2013 a janeiro de 2017.

Objetivos específicos:

- Identificar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de 97 isolados clínicos de *Klebsiella spp* provenientes de culturas (urocultura, hemocultura, cultura de secreção) de pacientes atendidos pelo Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB);
- Identificar a presença de linhagens hipermucoviscosas entre os isolados;
- Identificar linhagens com potencial virulento ou hipervirulento entre os isolados;
- Avaliar a similaridade genética entre os isolados por ERIC-PCR.

ii. Material e métodos

Desenho experimental



1. Cultivo, isolamento e armazenamento das linhagens bacterianas

Foram isoladas 92 linhagens de *K. pneumoniae* e 5 linhagens de *K. variicola* a partir de urocultura, hemocultura, secreções, *swab* retal, *swab* nasal e *swab* traqueal de pacientes do Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB). As linhagens foram numeradas de acordo com a data de chegada e identificadas por meio da utilização da plataforma VITEK-2 (bioMerieux) pelo Centro de Patologia Clínica do HUB/UnB. Após isolamento, cada linhagem foi cultivada durante 18 horas em meio LB (Sigma-Aldrich) a 37°C e armazenadas em freezer -80°C em LB 50% Glicerol (500uL/500uL).

2. Antibiograma

Após a identificação e crescimento prévio das linhagens em 5 mL de LB (Sigma – Aldrich), 100uL da suspensão bacteriana foram inoculados em Ágar Muller Hinton (Kasvi) por espalhamento com alça de Drigalski. Sobre cada inóculo, foram dispostos os discos de antibióticos Ciprofloxacina, Levofloxacina, Lomefloxacina, Orfloxacina, Norfloxacina, Ácido Pipemídico, Ácido Nalidíxico, Gatifloxacina, Amicacina, Piperacilina/Tazobactam, Cefaclor, Cefotaxima, Ceftazidima, Estreptomicina, Doxiciclina, Minociclina, Imipenem, Meropenem, Gentamicina, Ticarcilina/Ácido Clavulânico, Cefepime, Aztreonam, Tobramicina, Amoxicilina, Amoxicilina/Ácido Clavulânico, Ampicilina/Sulbactam, Cefoxitina, Cefazolina, Cloranfenicol, Ceftriaxona, Cefotaxima, Cefuroxima, Ertapenem, Nitrofurantoína, Sulfametoxazol/Trimetoprim, Sulfonamidas, Fosfomicina, Azitromicina, Tetraciclina (Sensidisc DME – Diagnósticos Microbiológicos Especializados). Depois de 24 horas de incubação a 37°C, as placas foram analisadas medindo-se o halo do disco-difusão. Os resultados obtidos foram classificados como susceptível, resistente ou multirresistente como descrito pelo fabricante dos discos utilizados representados na Tabela 1. A identificação do perfil de resistência (MDR: multirresistente, R: resistente; XDR: extensivamente resistente; PDR: pan-resistente) foi realizada de acordo com MAGIORAKOS et al., 2012.

3. Ensaio de produção de biofilme em superfície de poliestireno

A determinação da capacidade de produção de biofilmes foi feita como descrito por Stepanovic et al. (2004). Os testes para todas as linhagens, incluindo o controle negativo, foram feitos em triplicatas. As linhagens foram previamente inoculadas em meio LB a 37°C durante 18 horas. Em seguida, as linhagens foram inoculadas em uma placa de 24 poços com meio de cultura LB estéril e, nos poços do controle negativo, foi acrescentado apenas o meio LB estéril. A placa foi incubada a 37°C por 24 horas. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e os poços lavados com solução salina de NaCl 0,9% (9 mg/mL). Seguido da fixação do material que foi feita colocando-se metanol durante 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e a placa deixada em temperatura ambiente até secar. Depois de seca, foi adicionado cristal violeta por 5 minutos, para a coloração. Após esse tempo, o excesso de corante foi lavado com água corrente e a placa deixada em temperatura ambiente para secar. Em seguida foi adicionado ácido acético glacial 33% (1,65 mL/3,35 mL) para ressolubilização, por 5 minutos. Depois, a densidade óptica foi medida utilizando o espectrofotômetro de microplacas SpectraMax, no comprimento de onda de 570 nm. Para caracterizar a formação do biofilme foi realizada uma média aritmética dos três valores de absorbância obtidos para cada amostra. Se o valor obtido foi menor ou igual ao valor do controle negativo, a cepa foi considerada não produtora de biofilme. Se o valor da média da triplicata apresentou um valor maior que o valor do controle negativo, mas menor ou igual a duas vezes o valor do controle negativo, a cepa foi considerada produtora fraca de biofilme. Se o valor foi maior que duas vezes o valor do controle negativo, mas menor ou igual a 4 vezes o valor do controle negativo ela é considerada produtora moderada de biofilme. E, por fim, se o valor obtido foi 4 vezes

maior que o valor do controle negativo, a cepa foi classificada como produtora de biofilme forte. Como descrito na tabela 1.

Biofilme forte	Biofilme moderado	Biofilme fraco	Não produtora
$VA > 4x CN$	$4x CN \geq VA > 2x CN$	$2x CN \geq VA > CN$	$CN \geq VA$

Tabela 1 Modelo utilizado para a classificação de produção de biofilme de acordo com a média aritmética obtida da triplicata da absorbância atingida na leitura do teste. VA: valor de absorbância obtido da amostra. CN: valor de absorbância do controle negativo.

4. Teste de Hipermucoviscosidade

O ensaio de hipermucoviscosidade foi feito como descrito por Shon et al 2013. É um teste qualitativo, nomeado como “string test”. As amostras foram inicialmente inoculadas em meio LB estéril e inoculadas por 18 horas a 37°C. Após o pré-inóculo as cepas foram novamente inoculadas em meio LB Agar com 5% de sangue de carneiro por 24 horas e 37°C. Em seguida, o “string test” foi realizado, sendo considerado positivo quando a alça de inoculação foi capaz de gerar um filamento viscoso > 5 mm de comprimento, como se estivesse esticando as colônias bacterianas. A medição do filamento viscoso foi feita visualmente.



Figura 7 Representação do fenótipo hipermucoíde em *Klebsiella pneumoniae* e como é executado o ensaio de “string test”. Os resultados foram obtidos visualmente.

5. Detecção dos genes *rmpA* e *magA*

O ciclo utilizado para a detecção dos genes *magA* (1.281 bp) e *rmpA* (535 bp) foi padronizado por Kuo-Ming Yeh et al 2007. As cepas foram previamente inoculadas em LB estéril por 18 horas a 37°C e o DNA extraído. A sequência dos primers utilizados foram: *magA* forward 5'-GGTGCTCTTTACATCATTGC-3', *magA* reverse 5'-GCAATGGCCATTTGCGTTAG-3'. *RmpA* forward 5'-ACTGGGCTACCTCTGCTTCA-3', *rmpA* reverse CTTGCATGAGCCATCTTTCA-3. Como controle positivo foram utilizadas duas cepas KpAM11 e Kp 49C cedidas pelo Prof. Dr. André Pitondo-Silva da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). O ciclo de PCR utilizado foi o de 95°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 50°C durante 1 minuto e 72°C por 2 minutos, e finalizando 72°C por 7 minutos. Após a amplificação, a presença dos genes foi detectada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (1,5 g/100 mL).

6. Sobrevivência em soro e sangue humano

O teste para verificar a taxa de sobrevivência das cepas bacterianas foi feito de acordo com DeLeo 2017. Para ensaios com sangue humano, as cepas foram inoculadas previamente em LB estéril por 18 horas a 37°C. Após o tempo determinado, todas as cepas foram diluídas para uma D.O. de 0,3 a 600 nm (aproximadamente 10⁷ CFU/mL). Logo em seguida as cepas foram centrifugadas por 4 minutos a 12.000g e o pellet foi ressuspensão em 550 uL de sangue, e o eppendorf foi colocado em um agitador sob agitação de 60 rpm e temperatura de 37°C. A cada ponto de parada, 10uL do tubo foi coletado e diluído a 10⁻⁴, e depois da diluição, 10uL das últimas duas diluições foram

inoculadas em meio MacConkey ágar por 18 horas em 37°C. Os tempos de parada foram 0,30,60 e 120 min. Para o ensaio com soro humano, todos os passos acima descritos foram seguidos, porém as bactérias foram inoculadas em soro, e portanto o sangue coletado não foi heparinizado para que houvesse a coagulação sanguínea, e o soro pudesse se separar.

7. Amplificação de sequencias ERIC para determinação do perfil de similaridade genética

Para a análise do perfil de similaridade genética, 100 ng do DNA de cada linhagem, foi extraído conforme descrito por Ausubel *et al.* 1988, foram utilizados para a amplificação de sequências ERIC (sequencias consensus repetitivas de enterobactérias) conforme descrito por Versalovic et al. 1991. Após a amplificação, o perfil de bandas foi analisado em eletroforese em gel de agarose 1,5% (1,5g/100mL). O perfil de similaridade genética entre as linhagens foi determinado por meio do uso do *software* Bionumerics versão 5.0. As condições de corrida são: 98°C por 10 segundos, seguido de 30 ciclos de 98°C durante 10 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, e a extensão final com 72°C por mais 10 minutos. O ensaio foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. André Pitondo-Silva da Universidade de Ribeirão Preto, SP (UNAERP).

8. Tipagem capsular do sorotipo K1

A tipagem capsular foi realizada por detecção por PCR de acordo com Chi-Tai Fang et al 2007. Os primers foram desenhados quatro primers com base nos loci *wzy* K1 (1.282 bp) e *wzx* K1 (1.045bp) que são altamente conservados entre as linhagens. Para a realização da PCR, o DNA deve estar em uma concentração de 100 ng/mL. O ciclo utilizado teve uma desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos com a 96°C de desnaturação por 30 segundos, anelamento por a 55°C por 15 segundos e

extensão a 74°C durante 1 min, e a extensão final a 72°C por 10 minutos. Os controles positivos utilizados foram a cepa controle NTUH K2044 e a linhagem Kp 01 cedidas pelo Prof. Dr. André Pitondo-Silva da Universidade de Ribeirão Preto, SP (UNAERP). Foram consideradas com o gene K1, as linhagens que apresentaram bandas para ambos os genes. A sequência dos *primers* utilizados foram: *wzx K1 forward* 5'-GTAGGTATTGCAAGCCATGC-3', *wzx K1 reverse* 5'-GCCCAGGTTAATGAATCCGT-3, *wzy K1 forward* 5'-GGTGCTCTTTACATCATTGC-3, *wzy K1 reverse* 5'-GCAATGGCCATTTGCGTTAG-3'.

9. Cultivo da linhagem celular HEp-2 (carcinoma epidermoide de laringe humana)

Para a realização da caracterização da sobrevivência e citotoxicidade de linhagens de *K. variicola* em células humanas foram utilizadas a linhagem celular HEp-2, derivada de carcinoma epidermoide de laringe humana obtida do Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz. As linhagens foram armazenadas em freezer -80°C em soro fetal bovino (Gibco) e 10% de DMSO. Para a realização dos ensaios, a linhagem celular foi cultivada em garrafas de cultura em meio DMEN (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% do antibiótico PenStrep (Gibco) e mantidas em estufa a 37°C com uma atmosfera contendo 5% de CO₂.

10. Infecção de células HEp-2 com os isolados de *K. variicola*.

As células epiteliais HEp-2 foram cultivadas em meio DEMEN suplementado com 10% de soro fetal e 1% de PenStrep (Gibco). A cultura foi mantida a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. As células foram infectadas pelas bactérias conforme descrito por (Favre-Bonte *et al.*, 1999) utilizando-se o MOI de 1:1000. O período de estimulação em todos

os experimentos foi de 2 horas. Após esse período as células foram lavadas três vezes com a solução PBS 1X e em seguida, adicionado meio DEMEN com 1% de Gentamicina para a finalização do período de infecção.

11. Determinação da sobrevivência bacteriana em células HEp-2

As células HEp-2 previamente cultivadas em placas de 24 poços apresentando confluência de 70% foram submetidas à infecção utilizando-se o MOI de 1:1000. Após duas horas, os poços foram lavados três vezes com PBS e em seguida foi adicionado meio de cultura DMEN com 1% de Gentamicina (10mg/L) para o término do período de infecção. Após 3, 6 e 24 horas as células foram lavadas novamente 3X com PBS e em seguida desaderidas e lisadas com PBS 1X gelado e 0,5% de Triton-100X (Sigma-Aldrich). A placa foi centrifugada a 12.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resuspenso em 100 uL de PBS 1X. Foi feita uma diluição em 90uL de PBS (1:10) e em seguida o lisado diluído e o não diluído foram plaqueados em meio Ágar-MacConkey (Kasvi) com o auxílio de uma alça de Drigalski. Após 24 horas de incubação a 37°C, o número de unidades formadoras de colônias (CFU) foi determinado.

12. Teste de viabilidade de células HEp-2 após infecção

A viabilidade de células HEp-2 infectadas foi determinada pelo método colorimétrico MTT, que verifica a viabilidade celular por meio da conversão da substância MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) em cristais de Formazan por meio da ação de desidrogenases mitocondriais. Esses cristais de Formazan que são produzidos por células viáveis, após serem solubilizados, são submetidos à

espectrofotometria. O controle de morte celular foi feito com DMSO 20% e também outro controle onde as células não foram infectadas.

O teste de viabilidade celular foi realizado em triplicata, em placa de 96 poços. As células foram plaqueadas e no dia seguinte, com uma confluência de 70% foi realizada a infecção. Após 2 horas de infecção, foi acrescentado nos poços meio DMEN (Sigma-Aldrich) com 1% de Gentamicina (10mg/L). A placa de cultura foi novamente incubada a 37°C com 5% e CO₂ e após 3, 6 e 24 horas foi realizada a adição do MTT. A placa novamente incubada sob proteção da luz.. Após duas horas da adição do MTT foi realizada a ressolubilização utilizando 100uL de DMSO 100% . A placa foi submetida à leitura das absorvâncias em espectrofotômetro (SpectraMax) no comprimento de onda de 570 nm. Quanto menor a viabilidade celular, menor a redução do MTT e portanto menos colorido o poço, e menor o sinal obtido pelo espectrofotômetro.

13. Análise dos dados

A análise estatística dos dados obtidos foi feita pelo *software* GraphPadPrism versão 7.0. Foram considerados como valores significativos com $p < 0,05$, e o teste realizado foi o ANOVA one-way.

iii. Resultados

1. Dados dos isolados

A maioria dos isolados de *K. pneumoniae* analisados foram obtidos de urocultura (77,17%), seguido por cultura de secreção (13,04%), swabs (5%) e hemocultura (3,26%). 1,08% dos isolados não tiveram seus dados de origem fornecidos (Figura 8A). A elevada prevalência em urocultura e cultura de secreção reflete o perfil oportunista das infecções causadas pela bactéria, uma vez que, grande parte das infecções nosocomiais acomete o trato urinário e/ou são causadas pela colonização de dispositivos (como cateteres) por *K. pneumoniae*.

De acordo com os dados dos pacientes do HUB de onde foram obtidos os isolados, a maioria das infecções foi observada em não internos no hospital, indicando que esses patógenos estão circulantes na comunidade. Dos pacientes portadores dos isolados, 63,04% eram de origem externas ao hospital (ou da comunidade) e 26,09% apresentaram infecções após a internação. 1Dentre os isolados 10,87% dos isolados não apresentaram as informações de local do paciente (Figura 8B).

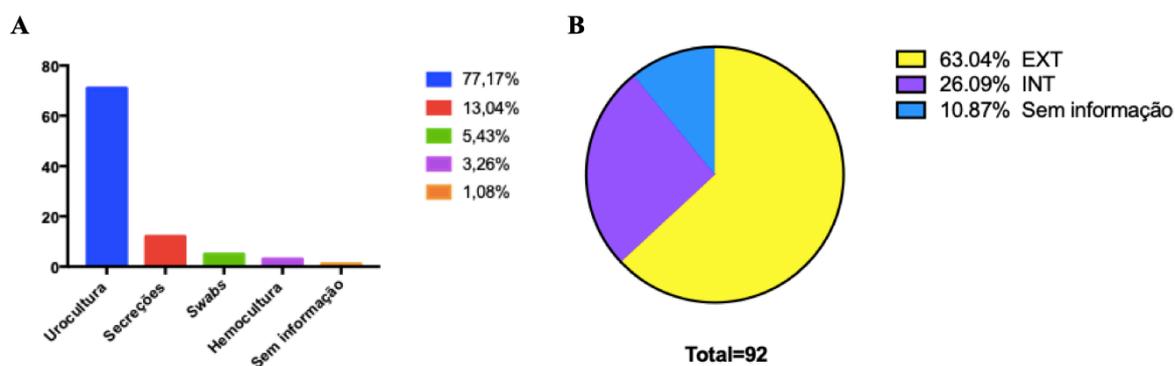


Figura 8 Origem dos isolados de *K. pneumoniae* do Hospital Universitário de Brasília. A) Isolados de *K. pneumoniae*, 77,17% foram isolados de infecções urinárias, 13,04% foram isoladas de secreções (escarro, lavado traqueal, líquido ascético, lavado gástrico, ponta de cateter), 5,43% isolados de swabs anal, traqueal e nasal), 3,26% isolados de hemocultura e 1,08% dos isolados não vieram com a informação sobre o local de origem do isolado. B) Origem dos pacientes infectados com *K. pneumoniae*. Foram consideradas origens internas do hospital (INT): Clínica Médica (CLIM); Maternidade; Clínica de Pronto Atendimento Pediátrico (CPAP); Clínica de Pronto Atendimento Adulto (CPAA). Foi considerada como local externo ao hospital (EXT): Emergência e pacientes que não foram internados previamente.

2. Antibiograma

O ensaio de antibiograma realizado com as linhagens de *K. pneumoniae* (Figura 9) indicou que 56 das linhagens de *K. pneumoniae* apresentaram sensibilidade a todos os antimicrobianos testados representando 60,87% de toda a coleção. 24 isolados de *K. pneumoniae* (26,09%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos analisados e 12 tiveram seu perfil de resistência caracterizados como multirresistentes (MDR), uma vez identificada insensibilidade a 3 categorias diferentes de antibióticos. Apesar da maior parte dos isolados apresentarem sensibilidade aos antimicrobianos, a elevada quantidade de estirpes resistentes e multirresistentes é preocupante, uma vez que a resistência a antimicrobianos dificulta o tratamento terapêutico, e em alguns casos essa resistência somada a outras características biológicas das linhagens, como por exemplo uma super expressão capsular, pode impedir o sucesso no tratamento terapêutico. Dentre

os isolados MDR houve susceptibilidade as seguintes classes de antibióticos: aminoglicosídeos, beta láctamicos e penicilínicos, carbapenemases, cefalosporinas, fluorquinolonas e monobactam (Tabela 3 e Figura 11). Como demonstrado na Tabela 6, todas as estirpes MDR possuem pelo menos dois fatores de virulência que certamente colaborou para o estabelecimento da infecção e interferiu no tratamento terapêutico de seus hospedeiros.

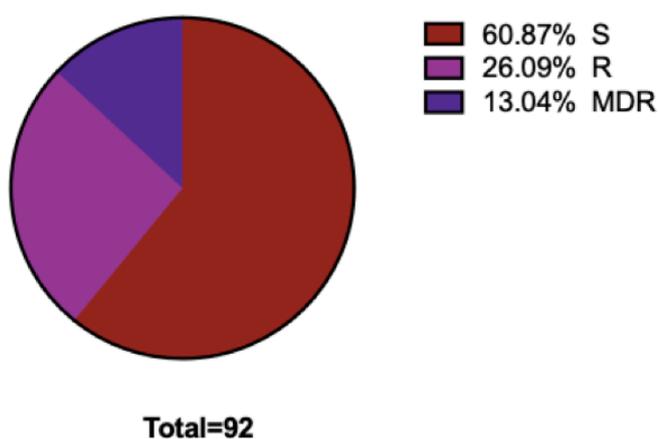


Figura 9 Perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* sendo 60,87% sensíveis a todos os antimicrobianos testados (Tabela 1), 26,09% resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados e 13,04% da coleção apresentaram multirresistência(MDR) que se caracteriza pela resistência a 3 classes diferentes de antibióticos.

Tabela 2 Número de isolados MDR resistentes às classes de antibióticos testados no antibiograma.

Classe do antibiótico	Número de isolados MDR resistentes
Aminoglicosídeos	4/12
Beta lactâmicos e penicilínicos	2/12
Carbapenemases	3/12
Cefalosporinas	12/12
Fluorquinolonas e quinolonas	12/12
Monobactam	9/12

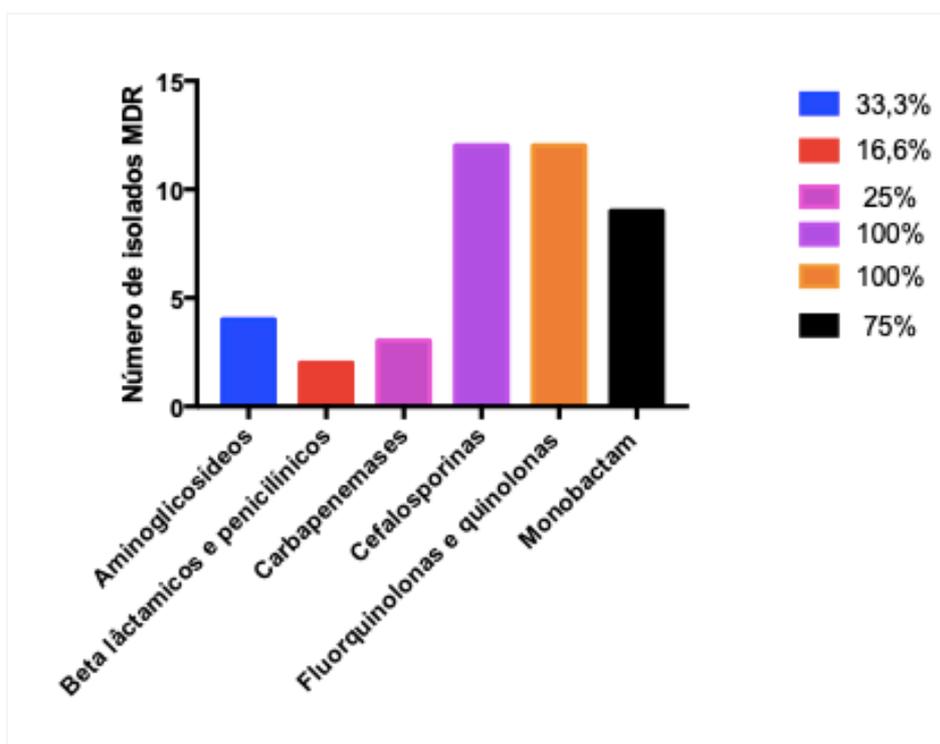


Figura 10 Porcentagem de resistência dos isolados MDR de acordo com a classe de antibióticos analisadas no antibiograma. Todos os 12 isolados MDR apresentaram resistência às cefalosporinas e fluorquinolonas e quinolonas, 75% dos isolados apresentaram resistência às Cefalosporinas e fluorquinolonas e quinolonas, 75% dos isolados apresentaram resistência à classe de monobactam, 33,3% da coleção de *Klebsiella pneumoniae* MDR apresentou resistência à classe de aminoglicosídeos e 16,6% foram resistentes a beta lactâmicos e penicilínicos.

3. Ensaio de Hiper mucoviscosidade

O “string test” (Figura 7) foi realizado pelo menos três vezes para verificar qualitativamente nas amostras de *K. pneumoniae* o número de cepas que apresentam o fenótipo de hiper mucoviscosidade (hmKP), uma das características mais relevantes das cepas consideradas hipervirulentas. Entre as amostras de *K. pneumoniae*, 13 apresentaram o fenótipo característico representando uma porcentagem de 14,13% do número total de amostras. Considerando que o fenótipo hmKP é um marcador de hipervirulência, a proporção observada é alta e preocupante, pois linhagens hipervirulentas têm a capacidade de infectar não somente pacientes imunocomprometidos, como também pacientes saudáveis sem registros prévios de condições patológicas

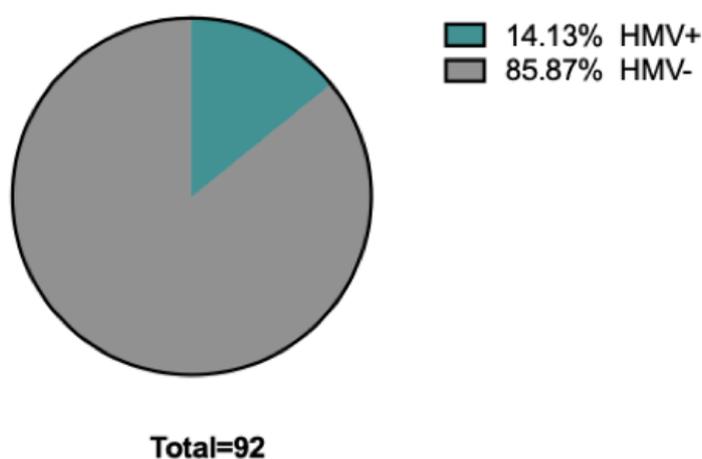


Figura 11 . Proporção de linhagens de *Klebsiella pneumoniae* hmKP.14,13% das amostras apresentaram o fenótipo e 85,87% delas não foram consideradas hmKP

4. Caracterização da produção de Biofilme

Após o ensaio de formação do biofilme, 54 amostras (58,70%) de *K. pneumoniae* apresentaram produção de biofilme forte, 22 amostras (23,91%) foram consideradas

formadoras de biofilme moderado e 16 (17,39%) tiveram uma produção de biofilme fraca (Figura 12A). Das linhagens hmKP, os isolados considerados produtores de biofilme forte (9 isolados) também tiveram uma maior proporção na população analisada, o que representou 69,23% do total de amostras com o fenótipo hmKP. Além disto, entre as hmKP, 3 produziram biofilme moderado (23,08%), e por fim 1 isolado foi classificado como produtor de biofilme fraco (7,69%) (Figura 12B). Os resultados sugerem que há uma percentagem considerável de cepas de *K. pneumoniae* que circulam na população atendida pelo HUB apresentando produção de biofilme forte e moderado, o que pode dificultar o tratamento com antibióticos.

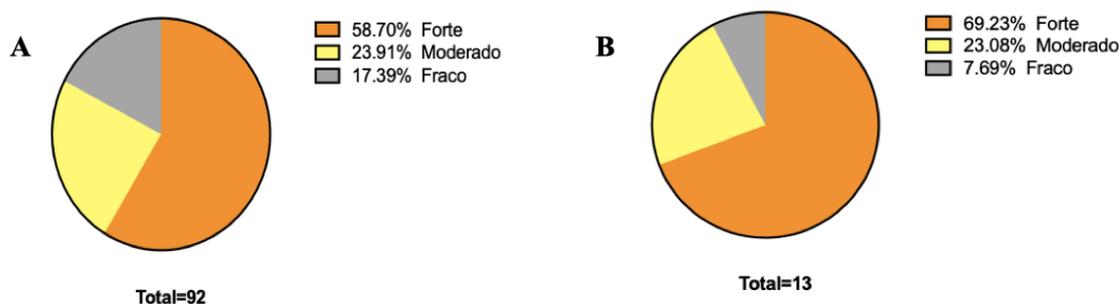


Figura 12 Caracterização da produção de biofilme. A) Produção de biofilme dos isolados de *Klebsiella pneumoniae*, mais da metade da coleção apresentou-se como produtor de biofilme forte, 23,91% dos isolados produzem biofilme moderado e 17,39% apresentaram uma produção fraca de biofilme. B) Produção de biofilme das linhagens hmKP, 69,23% dos isolados têm uma produção forte de biofilme, 23,08% produzem biofilme de forma moderada e 7,69% são produtores fracos de biofilme.

5. Sobrevivência em soro e sangue humano

Nove linhagens HmKP e cKP foram selecionadas aleatoriamente para a determinação de suas capacidades de sobrevivência em soro e sangue humano. Após o ensaio de sobrevivência em sangue humano, foi observado que ambas as linhagens cKP e HmKP sobrevivem e se multiplicam (Figura 13). Porém, as HmKP apresentaram taxa

de crescimento e sobrevivência maior do que as cKP, sugerindo que o fenótipo é um determinante de virulência que pode conferir a bactéria um maior sucesso na invasão e colonização do hospedeiro (Figura 14).

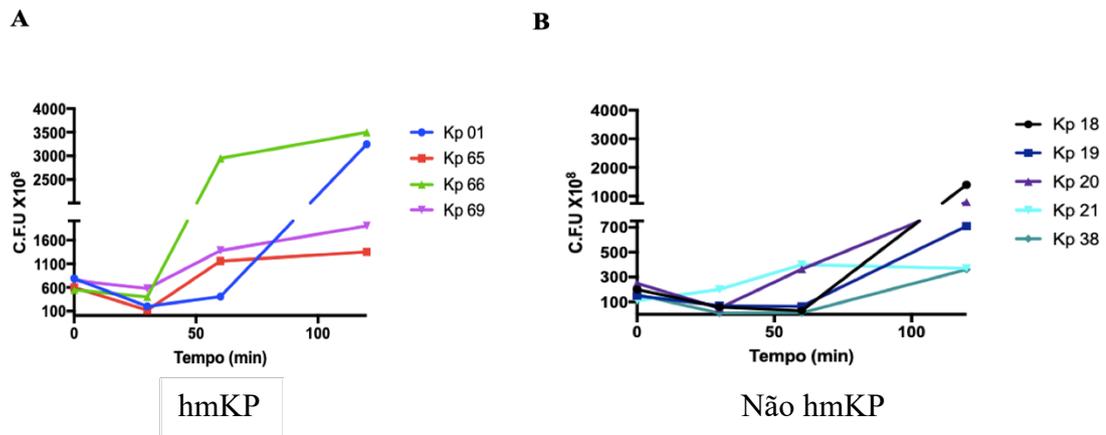


Figura 13 Sobrevivência dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* em sangue humano. A) Sobrevivência de linhagens hmKP em sangue humano, todos os isolados sobreviveram e cresceram com o decorrer do tempo. B) Sobrevivência de linhagens de *K. pneumoniae* não hmKP, todos os isolados sobreviveram e cresceram no sangue.

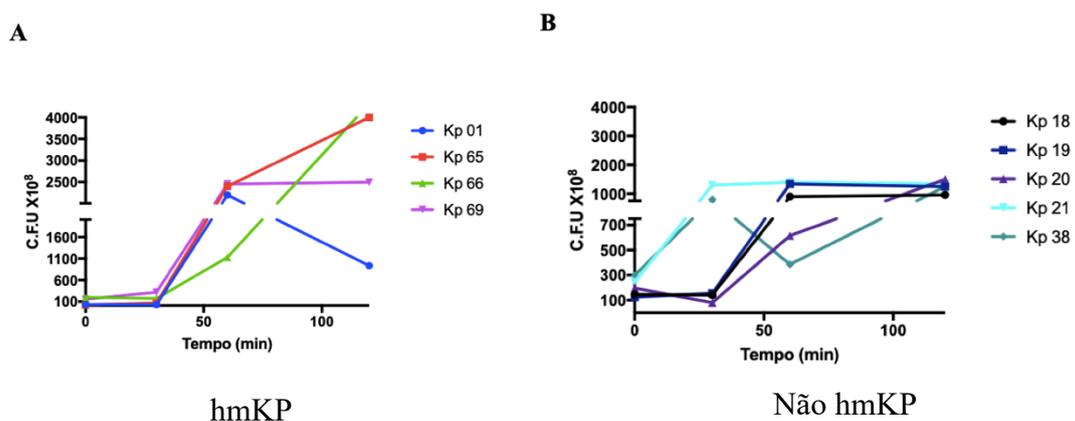


Figura 14 Sobrevivência dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* em soro humano. A) Sobrevivência de linhagens hmKP em soro humano, todos os isolados sobreviveram e multiplicaram -se. B) Sobrevivência de linhagens de *K. pneumoniae* não hmKP houve crescimento de todos os isolados.

Assim como no sangue humano, a sobrevivência bacteriana ao soro humano (Figura 14) apresentou uma maior proliferação das das linhagens hmKP com relação as hmKP negativas também foi observada. Porém, as cKP (Figura 14B) apresentaram maior taxa de multiplicação em soro humano do que em sangue, provavelmente devido a

presença do sistema complemento no soro. Apenas uma amostra hmKP (Figura 14A) apresentou uma diminuição do seu crescimento em soro quando comparada com o crescimento em sangue humano.

6. Detecção dos genes *rmpA* e *magA*

A detecção dos genes *magA* e *rmpA* foi feita por PCR como sugerido por Kuo-Ming Yeh et al 2007. O gene *rmpA* (Figura 15C) funciona como regulador do fenótipo HMV e sua presença foi observada em 18 amostras da coleção. Já o gene *magA* (Figura 15B), gene que codifica o fenótipo, está presente em 6 amostras das quais 3 apresentaram o fenótipo hmKP e produção de biofilme forte. Todas as amostras que apresentaram apenas a presença do gene *magA* tiveram uma produção de biofilme forte. Dentre as amostras da coleção, apenas duas têm ambos os genes. Embora esses genes sejam responsáveis pelo fenótipo, o resultado apresentado pela Tabela 4 sugere que existem outros genes que codificam essa característica, já que algumas amostras que tiveram resultado positivo para o de hiper mucoviscosidade, não tiveram a presença de ambos os genes, ou de um deles. No total 22 amostras de *K. pneumoniae* tiveram a presença de um ou ambos os genes. Das 13 amostras hmKP (Figura 11), 4 não apresentaram a presença dos genes e todas foram isoladas de uroculturas e não produzem biofilme fraco (Tabela 3).

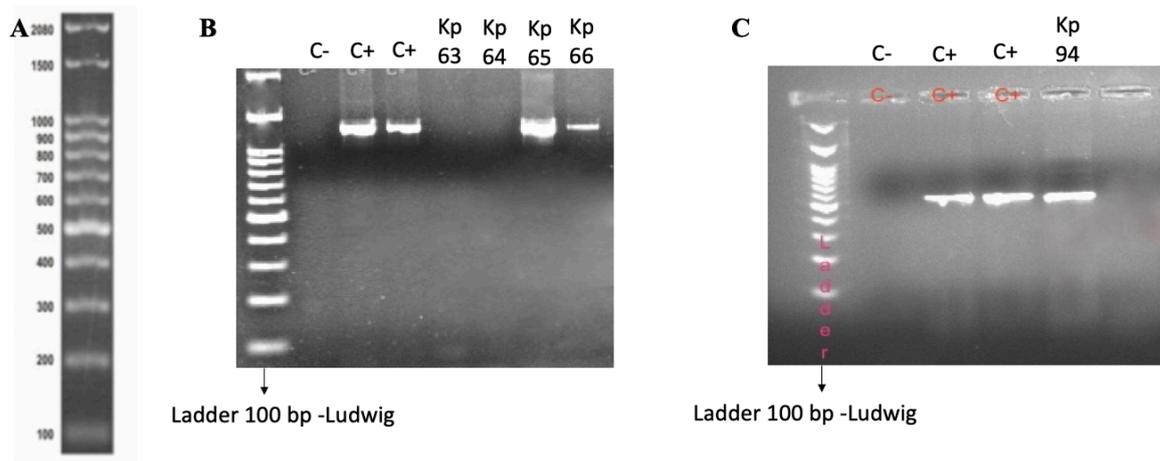


Figura 15 Representação da eletroforese em gel de agarose (1% 0,9g/60mL) para verificar a presença dos genes produtores do fenótipo de hiper mucoviscosidade *magA* e *rmpA*. A) Mapa do marcador molecular utilizado para verificar tamanho das bandas. B) Corrida da PCR com o gene *magA* com 1.282 bp, na sequência marcador de peso molecular, controle negativo(C-), controles positivos(C+) K49C e KPAM11 (linhagens controle) respectivamente e amostras de *K. pneumoniae* da coleção da Kp 63-66 sendo as duas últimas positivas para a presença do gene *magA*. C) Corrida da PCR com o gene *rmpA* com 535bp, na sequência marcador de peso molecular, controle negativo (C-), controles positivos (C+) K49C e KPAM11 e amostra de número 94 da coleção de *K. pneumoniae* isolados do Hospital Universitário de Brasília (HUB).

Tabela 3 Cultura de origem e produção de biofilme dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* hmKP que não apresentaram os genes *magA* e *rmpA*.

Isolados	Produção de Biofilme	Origem do isolado
Kp 61	Moderado	Urocultura
Kp 69	Forte	Urocultura
Kp 74	Forte	Urocultura
Kp 75	Forte	Urocultura

Tabela 4 Produção de biofilme e de fenótipo hmKP dos isolados de *K. pneumoniae* portadores de *magA* e/ou *rmpA*.

Isolados	Hiper mucoviscosidade	Produção de Biofilme	Presença dos genes	
			<i>magA</i>	<i>rmpA</i>
Kp 01	X	Forte	X	
Kp 65	X	Forte	X	
Kp 66	X	Forte	X	
Kp 68		Forte	X	
Kp 78		Fraco		X
Kp 79		Fraco		X
Kp 80	X	Fraco		X
Kp 83	X	Forte		X
Kp 84		Forte		X
Kp 85		Fraco		X
Kp 86		Fraco	X	X
Kp 87		Moderado		X
Kp 88		Forte		X
Kp 89		Moderado		X
Kp 90		Forte		X
Kp 91		Forte		X
Kp 92	X	Moderado		X
Kp 93	X	Forte		X
Kp 94		Forte		X
Kp 95		Moderado	X	X
Kp 96	X	Forte		X

7. Detecção do sorotipo K1 por PCR

A genotipagem capsular foi realizada por PCR em todos os 92 isolados de *Klebsiella pneumoniae* como demonstrado na figura 16. Para a identificação do tipo K1 de cápsula, foram utilizados 2 pares de *primers* de duas regiões altamente conservadas do genoma da espécie. Os *primers* desenhados tinham 1.282bp e 1.045bp. 8 isolados de *K.pneumoniae* apresentaram bandas para os 2 pares de pares analisados e portanto o seu tipo capsular é o K1, o qual é altamente associado com linhagens hipervirulentas que além de acometeram pacientes imunocomprometidos também acometem pacientes saudáveis

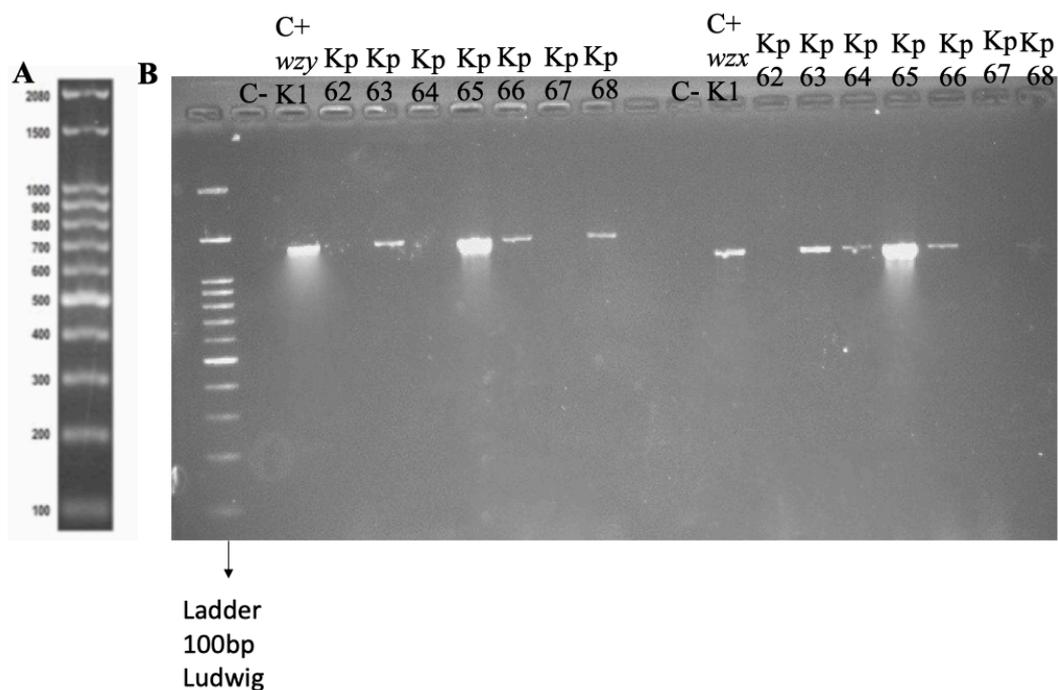


Figura 16 Eletroforese em gel de agarose 1% contendo a amplificação dos genes *wzy* e *wzx* específicos para o sorotipo K1 de *Klebsiella pneumoniae*. A) Mapa do marcador molecular utilizado para verificar tamanho das bandas. B) Gel de eletroforese da PCR com os isolados de *K. pneumoniae*. Na sequência da esquerda para a direita: ladder 100bp, controle negativo (C-), controle positivo para *wzy* K1, Kp's 62-62, C-, controle positivo para *wzx* K1, Kp's 62-68

Todos os 8 isolados que apresentaram os dois genes do K1, têm outros fatores de patogenicidade, sugerindo serem possíveis isolados hipervirulentos. As características desses isolados estão representadas na Tabela 5.

Tabela 5 Caracterização microbiológica e genético de todos os isolados com o gene K1, altamente associado com hipervirulência em *K. pneumoniae*. Caracterização quanto à resistência a antimicrobianos, hipermucoviscosidade, produção de biofilme e presença dos genes *magA* e *rmpA*.

Isolados	Antibiograma	Hipermucoviscosidade	Presença dos genes		Produção de Biofilme
			<i>rmpA</i>	<i>magA</i>	
Kp 63	Sensível				Forte
Kp 65	Resistente*	x		x	Forte
Kp 66	Sensível	x		x	Forte
Kp 68**	Sensível			x	Forte
Kp 69**	Sensível	x			Forte
Kp 86	MDR***		x	x	Fraco
Kp 94	Resistente****		x		Forte
Kp 98	Sensível		x		Forte

* Ciprofloxacina, cefepime, norfloxacina e ofloxacina; ** Isoladas do mesmo paciente;

*** Ciprofloxacina, cefepime, levofloxacina, norfloxacina e ofloxacina; ****

Ciprofloxacina, levofloxacina e ofloxacina.

8. ERIC-PCR

Os resultados do ERIC-PCR demonstraram que os isolados foram divididos em 4 grandes grupos com similaridade de aproximadamente 59% entre eles. Dentro desses grupos formaram-se *clusters* com similaridade genética maior que 88%, e um clone, representado pelas amostras KPBSB 87 e KPBSB88, coletados no mesmo dia apesar de pacientes diferentes sendo um interno ao hospital (KPBSB87) e outro externo (KPBSB88), sugerindo que esse clone está disseminado tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade. Todos os isolados que apresentaram uma similaridade igual ou maior que 88% (KPBSB 27, KPSB 103; KPBSB 19, KPBSB 63; KPBSB 39, KPBSB

69;KPBSB64, KPBSB 65;KPBSB 54,KPBSB 72;KPBSB 55, KPBSB 66;KPBSB 74,KPBSB 79;KPBSB 82, KPBSB 83;KPBSB 46, KPBSB 48), apresentaram características genóticas e mecanismos de virulência associados com hiper mucoviscosidade (hmKP) e hipervirulência, além de multirresistência a antimicrobianos, produção de biofilme forte ou moderada. Em nenhum dos clusters houve uma característica específica que os diferenciasse dos demais, mais uma vez sugerindo a disseminação de linhagens patogênicas pelo ambiente hospitalar e comunidade. As amostras KPBSB 82, e KPBSB83, foram coletadas do mesmo paciente em dias diferentes, ambas apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos testados, e produção de biofilme forte. O isolado KPBSB 90 mostrou-se geneticamente distante dos demais, visto que não se agrupou aos demais isolados, sugerindo que possa pertencer a outra espécie. O dendrograma de similaridade genética entre os isolados de *K. pneumoniae* está representado na Figura 17.

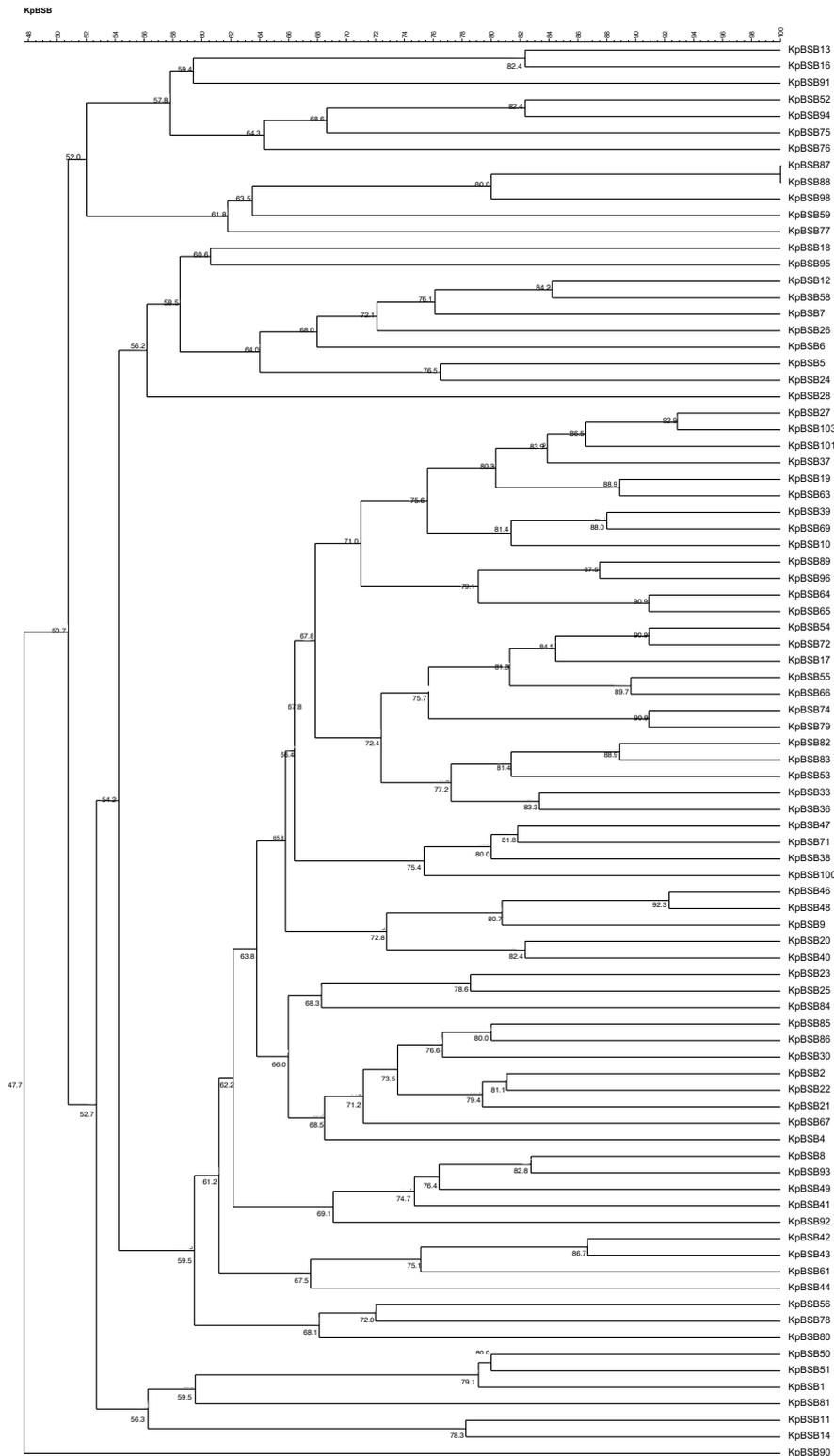


Figura 17 Dendrograma representativo de similaridade genética dos isolados de

Klebsiella pneumoniae, quadro com dados de ERIC- PCR. Os isolados foram separados em 4 grandes grupos com aproximadamente 50% de similaridade genética entre eles.

9. Análise das características dos isolados MDR.

Alguns isolados que foram positivos para o sorotipo K1 apresentaram outras características de virulência sugerindo potencial de hipervirulência como demonstrado na Tabela 6. A maioria é isolado de urocultura, e tiveram uma produção de biofilme forte. O fenótipo hmKP, foi observado apenas em 2 dos 12 isolados. Em relação aos genes relacionados ao fenótipo HMV, 3 tiveram o gene *rmpA* e 1 isolado teve a presença do gene *magA*. Nenhum dos isolados apresentou ambos os genes.

Tabela 6 Caracterização microbiológica e genética de todos os isolados de *K. pneumoniae* que apresentaram multirresistência (MDR), quanto a produção de biofilme, hiper mucoviscosidade e presença dos genes *magA* e *rmpA*.

Isolados	Origem dos isolados	Produção de Biofilme	Hiper mucoviscosidade	Presença dos genes	
				<i>magA</i>	<i>rmpA</i>
Kp 23	Urocultura	Forte			
Kp 27	Urocultura	Fraco			
Kp 48	Secreção	Fraco			
Kp 49	Urocultura	Forte			
Kp 52	Swab retal	Forte			
Kp 58	Secreção	Fraco			
Kp 75	Urocultura	Forte	X		
Kp 77	Secreção	Forte			
Kp 79	Urocultura	Fraco			X
Kp 84	Urocultura	Forte			X
Kp 86	Urocultura	Fraco		X	
Kp 93	Urocultura	Forte	X		X

Klebsiella variicola

Origem dos isolados, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, produção de biofilme, hiper mucoviscosidade, genotipagem capsular e detecção de *magA* e *rmpA*

Os cinco isolados de *K. variicola* foram inicialmente identificados como *K. pneumoniae* como observado por GARZA-RAMOS et al., 2015. Os isolados foram obtidos a partir de urocultura, hemocultura e cultura de ponta de cateter (Tabela 7), mostrando-se, assim, um patógeno que apresenta sucesso em causar infecções

nosocomiais, fato preocupante visto que *K. variicola* foi considerada mais virulenta que *K. pneumoniae* (ROMERO et al., 2018).

Em relação ao perfil de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados de *K. variicola*; 3 apresentaram sensibilidade a todos os antimicrobianos testados; 1 a apresentou resistência a pelo menos um antibiótico e 1 foi classificada como MDR, uma vez identificada resistência a 3 classes diferentes dos antibióticos testados. Nenhuma das amostras apresentou o fenótipo hipermucoviscoso como também não foram identificados os genes relacionados com o sorotipo capsular K1. A maioria dos isolados apresentou uma produção forte de biofilme, sendo que 1 isolado (Kv 35) teve uma produção fraca e 1 isolado (Kv 57) uma produção moderada após a repetição em triplicata do experimento (Tabela 7).

Tabela 7 Caracterização dos isolados de *Klebsiella variicola* de acordo com a origem, perfil de resistência a antimicrobianos, fenótipo HMV, produção de biofilme, presença dos genes *magA* e *rmpA*, e sorotipo K1.

Isolados	Origem	Antibiograma	HMV	Produção de Biofilme	Presença dos genes <i>rmpA</i>	Presença dos genes do sorotipo K1
Kv 15	Urocultura	MDR*	-	Forte		-
Kv 35	Hemocultura	Sensível	-	Fraco		-
Kv 57	Ponta de cateter	Sensível	-	Moderado		-
Kv 97	Urocultura	Sensível	-	Forte	x	-
Kv 104	Hemocultura	Resistente*	-	Forte		-

Determinação do potencial patogênico

1. Sobrevivência em soro e sangue humano.

Os isolados de *K. variicola* sobreviveram e cresceram em sangue, foram inoculadas inicialmente 10^7 de bactérias em sangue, e após 30min, foram recuperadas 10^5 da cultura bacteriana das amostras Kv15,35,97,104, embora tenha sido recuperado 10^5 do isolado Kv 57, após os 30 min, o isolado manteve o crescimento. Após os 30 minutos os isolados

se recuperaram e cresceram sendo recuperados após os 60 min 10^7 e após os 120 min foram recuperados 10^8 dos isolados, sendo a amostra Kv 104 a que apresentou o maior crescimento(Figura 18A). Curiosamente esse isolado Kv 57, não somente sobreviveu como também cresceu. Foram inoculados inicialmente 10^7 das amostras em soro humano, e todas apresentaram um decaimento no crescimento após os 30 min, sendo recuperado 10^6 de bactérias (Figura 18B). Após esse período de adaptação, nos tempos de 60 e 120 min foram recuperadas 10^7 e 10^8 de bactérias. Assim como nos isolados de *K. pneumoniae* houve sobrevivência e crescimento em ambas as condições.

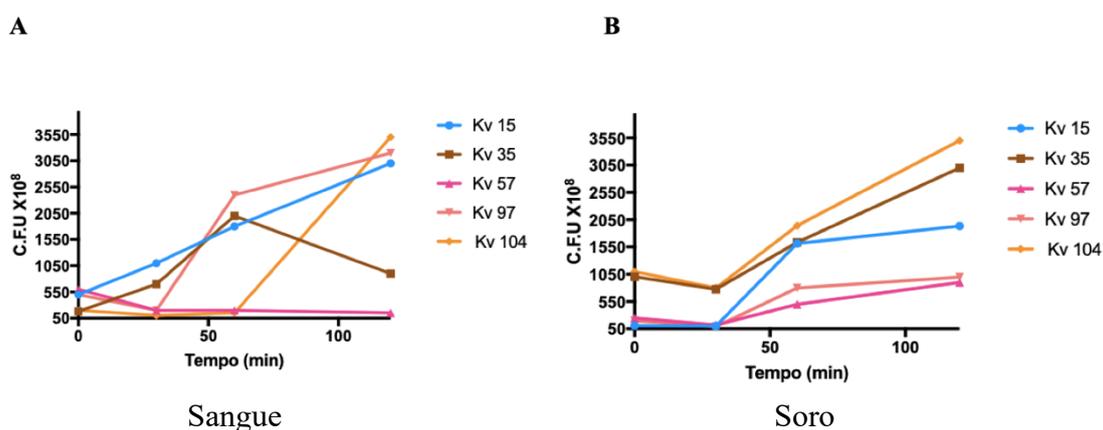


Figura 18 Sobrevivência de isolados de *Klebsiella variicola*. A) Sobrevivência em sangue humano. B) sobrevivência em soro humano. Em ambas as condições os isolados sobreviveram e multiplicaram com decorrer do tempo, exceto a estirpe K.v 57 que em sangue humano manteve seu crescimento.

2. Determinação da sobrevivência bacteriana no interior de células HEp-2

Após o período de 2 horas de infecção das células epidermóides HEp-2 com o inoculo inicial de 10^7 de cada isolado, observou-se um número elevado de unidades formadoras de colônias, sendo os isolados kv 57 e kv 35 os que apresentaram a maior quantidade de CFUs, tendo em média 4000 e 3000 unidades formadoras de colônias após o período de infecção respectivamente, indicando que além de sobreviverem dentro das

células também têm a capacidade de crescer. Todos os isolados sobreviveram internamente às células epidermoídes, porém o isolado Kv 104 apresentou o menor número de unidades formadoras de colônias, tendo em média menos de 1000 unidades, o que pode significar que esse isolado não infecta a célula HEp-2. Os isolados Kv 15 e Kv 97 apresentaram respectivamente 2000 e 1000 CFUs. Em suma os resultados sugerem que embora infectem e sobrevivam dentro das células HEp-2 com as linhagens de *K. variicola*, observou-se que todos os isolados sobrevivem dentro das células, \ isolados de menor crescimento tem uma capacidade infectante em células epiteliais menor (Figura 19).

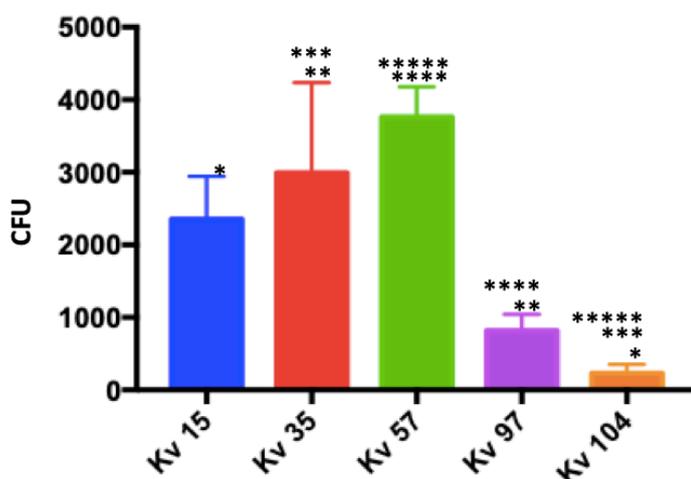


Figura 19 Determinação da sobrevivência de isolados de *K. variicola* em células epiteliais HEp-2. Todos os isolados cresceram dentro das células, sendo que Kv 35 e Kv 57 apresentaram um crescimento significativo em relação aos isolados de menor crescimento. O teste quantitativo utilizado foi o ANOVA one way feito pelo software GraphPadPrism versão 7.0

3. Teste de viabilidade de células HEp-2 após infecção

Após o período de 3 horas de infecção, os isolados apresentaram uma leve citotoxicidade para as células HEp-2, sendo que o isolado Kv 104, em nenhum dos tempos se mostrou citotóxico para as células, corroborando com o resultado apresentado na Figura 19, aonde

indica não ter um poder infectante alta quando comparado com os outros isolados. O isolado Kv 35 foi o mais citotóxico para as células após o período de 3 horas, apesar de quando comparado com uma linhagem ATCC de *Klebsiella pneumoniae*, mostrou-se menos citotóxico.

Os resultados de 6 horas após a infecção mostraram que as células já haviam se recuperado da infecção sendo que as células infectadas pelos isolados Kv 15 e Kv 104, apresentaram uma maior porcentagem de sobrevivência do que as células que não sofreram estímulo algum. Podendo ser tanto um mecanismo da própria célula, como um mecanismo do patógeno.

Após as 24 horas as células já estavam recuperadas, as infectadas com o isolado Kv 35,57 e 97 tiveram uma porcentagem de recuperação maior que as sem estímulo (NE) o que não tinha sido observado no tempo de 6 horas pós infecção, esse resultado sugere que pode ser algum mecanismo utilizado pelo patógeno para infectar, se manter e crescer dentro das células uma vez que esse três isolados foram o que apresentaram um maior crescimento em HEp-2 (Figura 19). Resumidamente, a Figura 20 mostra que de modo geral os isolados de *K. variicola* não são citotóxicos para as células epiteliais HEp-2 em nenhum dos períodos de 3,6 e 24 horas.

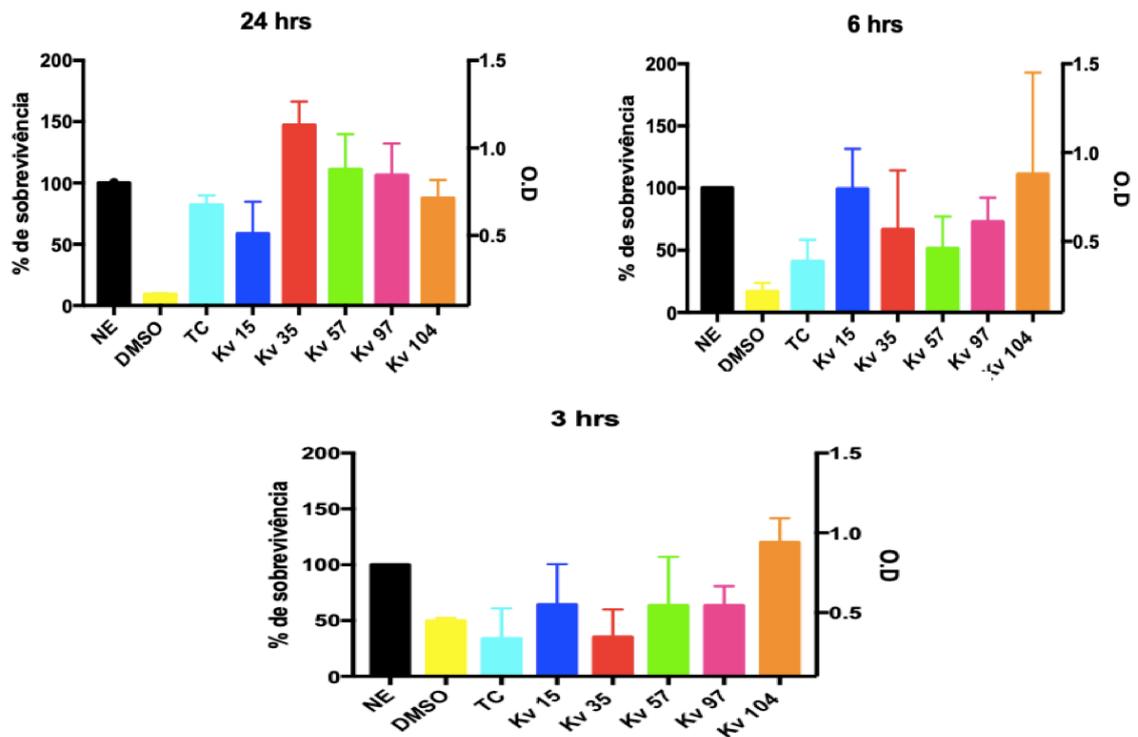


Figura 20 Viabilidade células epiteliais (Hep-2) após os tempos de 24, 6, 3 horas de infecção. Todas as células recuperaram sua viabilidade após as 24 horas. A taxa de sobrevivência foi calculada usando como referência a sobrevivência de 100% da cultura de células não infectadas e o controle de morte celular.

4. ERIC-PCR

Devido a similaridade genética entre *K. variicola* e *K. pneumoniae* o ERIC PCR foi realizado nas linhagens de *K. variicola* para confirmação de distinção entre espécies. Para tanto utilizou-se linhagens controles de *K. pneumoniae* para se comparar com as linhagens de *K. variicola*. O resultado do ensaio mostrou que as cepas apresentam uma similaridade genética de 63,4% como demonstrado na Figura 21.

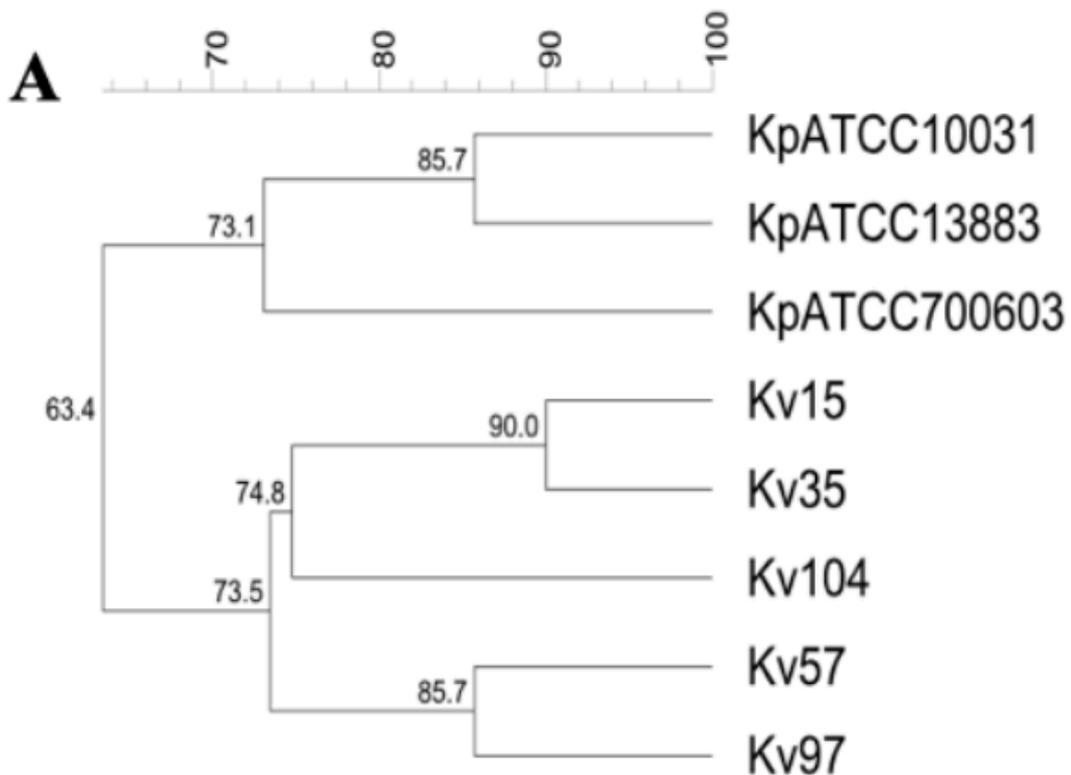


Figura 21 Dendrograma de similaridade genética entre os isolados de *Klebsiella variicola* e linhagens *Klebsiella pneumoniae*, gerado com dados de ERIC-PCR demonstrando então que são grupos diferentes de espécies.

iv. Discussão

Caracterização microbiológica.

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram negativo da família *Enterobacteriaceae*, considerado o principal patógeno dentre seu gênero relacionado com infecções nosocomiais e comunitárias (GARZA-RAMOS et al., 2018). É um patógeno oportunista, e portanto, acomete principalmente pacientes imunocomprometidos. *K. pneumoniae* é responsável por várias infecções distintas como pneumonia, septicemia, infecções sanguíneas, sendo infecções no trato urinário (UTI) uma das mais frequentes em pacientes internados (GARZA-RAMOS et al., 2018; LATIFPOUR; GHOLIPOUR; DAMAVANDI, 2016). Esse cenário foi observado em nossa coleção de *K. pneumoniae*, na qual mais de 77% das amostras foram isoladas de urocultura, 13,04% foram isolados de secreções diversas como escarro, 5,43% de *swabs* e 3,26% de hemoculturas (Figura 8A).

A infecção é definida como comunitária, quando em até 48 horas após a internação o paciente apresenta uma quantidade elevada de bactéria no sangue (bacteremia) (KO et al., 2002). Observou-se, segundo estudos (KO et al., 2002, LIN et al., 2010), que as infecções comunitárias predominantes em hospitais dos Estados Unidos, Argentina, Europa e Austrália são infecções do trato urinário, infecções em dispositivos internos como cateteres. Antigamente as infecções adquiridas na comunidade causadas por *K. pneumoniae* eram essencialmente pneumonia. Neste trabalho observou-se uma prevalência de infecções adquiridas na comunidade por *K. pneumoniae*, 63% dos isolados procederam de infecções comunitárias, sendo 26,09% isolados de infecções hospitalares (Figura 8B).

A resistência a antimicrobianos é uma preocupação mundial. O uso indevido de antibióticos e a transferência genética entre os micro-organismos fizeram com que esse

tema ganhasse mais destaque nos últimos anos (LEE et al., 2017; SAMPAIO; GALES, 2016). *K. pneumoniae* é considerada um reservatório para genes de resistência a antimicrobianos, apesar de não ser inerentemente resistente a eles, o patógeno produz quantidades moderadas de penicilases (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015; SAMPAIO; GALES, 2016; TZOUVELEKIS et al., 2012). No Brasil, existem estudos relatando a presença de genes de resistência a diferentes classes de antimicrobianos (PEREIRA et al., 2015; SAMPAIO; GALES, 2016). Dentre os genes, existem aqueles que se manifestam com uma maior frequência entre os isolados de *K. pneumoniae* nosocomiais, são eles: genes codificadores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), carbapenemases, aminoglicosídeos e fluorquinolonas (PEREIRA et al., 2015; SAMPAIO; GALES, 2016). Soma-se a esse aumento de linhagens resistentes de *K. pneumoniae*, aqueles isolados que apresentam uma multiressistência (MDR), sendo classificado como um patógeno MDR quando apresentar resistência a pelo menos 3 classes de antimicrobianos diferentes, a disseminação desse tipo de resistência também aumentou mundialmente nos últimos anos. (ANES et al., 2017; MAGIORAKOS et al., 2012).

Assim como observado por PEREIRA et al.,2015; SAMPAIO; GALES, 2016, ANES et al., 2017 os 12 isolados (13,04%) do nosso trabalho que apresentaram uma multirresistência, foram resistentes principalmente aos carbapenêmicos, fluorquinolonas e cefalosporinas (Tabela 2, Figura 10), assim como os isolados classificados como resistentes, que são 26,09% do número total de amostras (Figura 9). Curiosamente, a maioria dos isolados (60,87%) apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados, o que pode ser explicado pela produção forte ou moderada de biofilme por 82,61% dos isolados (Figura 12 A). O biofilme por ser uma matriz exopolissacarídica que protege os micro-organismos presentes nele da ação de antibióticos, mesmo que o

antimicrobiano atravessa a matriz ou as células presentes no biofilme sejam sensíveis ao antibiótico. Por se tratar de uma estrutura complexa alguns estudos relataram que a taxa de crescimento no biofilme é menor e, portanto a integração de genes de resistência ao genoma bacteriano comprometeria o fitness bacteriano, uma vez que sua replicação seria mais custosa (ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013; ANDERL; FRANKLIN; STEWART, 2000; COSTERTON; MONTANARO; ARCIOLA, 2005; ZÄHLLER et al., 2002). Embora ainda não exista uma ligação clara entre a resistência a antibióticos e a produção de biofilme como sugeriram ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2018; DE CAMPOS et al., 2016, sabe-se que a presença de fatores de patogenicidade como multirresistência e produção de biofilme permitem que o patógeno permaneça por mais tempo em ambiente hospitalar. Em nossa coleção obtivemos isolados com essas características como demonstrado na Tabela 6.

Contrariamente a ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2018; DE CAMPOS et al., 2016, existem autores que sugerem uma ligação direta entre a produção de biofilme e resistência a antimicrobianos, segundo eles o micro-organismo sob pressão antibiótica teve uma maior produção de biofilme (GHARRAH; MOSTAFA EL-MAHDY; BARWA, 2017; LEE et al., 2008; PRASHANTH et al., 2008; VUOTTO et al., 2014); alternativamente outros trabalhos sugerem que alguns genes de resistência quando codificados por plasmídeos, modulam a expressão do gene fimbrial, e conseqüentemente a formação de biofilme (HENNEQUIN et al., 2012). Em nosso trabalho isso não foi observado já que entre os isolados MDR, tivemos produtores de biofilme forte e fracos. (Tabela 6).

Hipervirulência x Hiper mucoviscosidade

Klebsiella pneumoniae hipervirulenta (hvKpn) é uma nova variante de *K. pneumoniae* que tem como principais características: causar infecções em pacientes saudáveis principalmente jovens; formar abscessos especialmente no fígado, e desenvolver metástases sobretudo no cérebro e olhos. Além disso, são amplamente associadas com um fenótipo hipermucoviscoso (hmKP), que nada mais é do que a super expressão da cápsula, o principal fator de virulência de *K. pneumoniae*. (KAWAI, 2006; LEE et al., 2006; POMAKOVA et al., 2012; SHON; BAJWA; RUSSO, 2013). Uma linhagem de *K. pneumoniae* é definida como hipermucoviscosa quando apresenta um filamento maior que 5 mm, após o alongamento de um colônia com uma alça em uma placa de ágar no teste semi-quantitativo *string test* (SHON; BAJWA; RUSSO, 2013). Em nosso trabalho observou-se que 14,13% (12/92) dos isolados apresentaram esse fenótipo (Figura 11). Apesar da taxa de mortalidade dessas cepas serem consideradas baixas (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017; POMAKOVA et al., 2012), uma vez que a maioria apresenta sensibilidade a várias classes de antibióticos, as consequências incapacitantes são devastadoras, pois costuma infectar o sistema nervoso central e olhos. Sendo assim, uma vez identificadas, a administração correta de antibióticos evita o desenvolvimento de incapacidades irreparáveis e até a morte (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017).

O número de linhagens que apresentam fenótipos multiresistentes e hipervirulentos tem aumentado consideravelmente. Existem estudos relatando o surgimento de linhagens hvKp/ hmkp multiresistentes (LIN et al., 2007; SU et al., 2008; YAO et al., 2015). Assim como eles, observamos em nossos resultados demonstrados na Tabela 6 que existem linhagens em nossa coleção que além de apresentarem uma multiresistência que por si só é preocupante como citado anteriormente, apresentam

traços do fenótipo hipervirulento como hipermucoviscosidade, presença do gene *rmpA*, que é um gene regulador do fenótipo.

Entre dos 78 tipos de sorotipos já identificados em *K. pneumoniae*, o sorotipo K1 está entre os mais frequentes e predominantes em infecções humanas causadas por *K. pneumoniae*. Os genes responsáveis pela síntese e translocação dos antígenos capsulares são codificados no *locus cps*, que está localizado no cromossomo bacteriano (BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014; PACZOSA; MECSAS, 2016; PODSCHUN; ULLMANN, 1998). O gene *magA* foi caracterizado como o gene responsável pelo fenótipo hipermucoviscoso (FANG et al., 2004; GUO et al., 2017; LEE et al., 2006; YEH et al., 2007). Estudos seguintes porém, observaram que o *magA* codifica uma polimerase específica do sorotipo capsular K1, essa enzima é responsável pela formação da estrutura característica da cápsula, portanto o gene *magA* foi renomeado como *wzy_K1*, assim como os demais sorotipos (FANG et al., 2004, 2010; YEH et al., 2007), por isso para a tipagem capsular por PCR, utiliza-se como primer esses genes, como foi feito nesse trabalho (Figura 16/Tabela 5). Assim como CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017; YAO et al., 2015, observamos que nem todos os isolados que foram considerados com tipagem K1, apresentaram o gene *magA* (Tabela 5/6), sugerindo que existem outros genes associados com o fenótipo hipervirulento/hipermucoso que não se encontram no cluster *cps*.

Os genes responsáveis pela regulação positiva do fenótipo hmKP são o *rmpA2*, e sua forma truncada *rmpA*, os dois podem ser codificados tanto no cromossomo, como no plasmídeo, e apresentarem mais de uma cópia por célula bacteriana (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017; STRUVE et al., 2015; YEH et al., 2007).

De acordo com HSU et al., 2011, apenas o *rmpA* plasmidial regula de forma positiva os genes do *cps*, embora a presença de ambos os genes em quantidade elevada esteja associado com linhagens de *K. pneumoniae* hipervirulentas (HSU et al., 2011; YEH et al., 2007; YU et al., 2006). Similarmente ao *wzy_K1*, foram descritas linhagens sem o genes *rmpA/rmpA2* com o fenótipo hipervirulento/hipermucoviscoso ao mesmo tempo em que linhagens positivas para *rmpA/rmpA2* não apresentarem nenhum dos fenótipos. Utilizamos como referência para a síntese do primer *rmpA* plasmidial (YEH et al., 2007; YU et al., 2006), nossos resultados concordam com YEH et al., 2007; YU et al., 2006, uma vez que entre dos nossos isolados, 17 foram positivos para a detecção do gene *rmpA* plasmidial, porém apenas cinco apresentaram o fenótipo hipermucoviscoso; da mesma forma tivemos isolados que embora não apresentassem o gene *rmpA* não apresentaram o fenótipo hipermucoso (Tabela 4/5). Alguns autores sugerem que mutações nesses genes, *rmpA/rmpA2* presentes nessas linhagens, podem produzir proteínas *rmpA/rmpA2* alteradas, levando a um perfil não hipermucoviscoso (YU et al., 2015).

Embora linhagens hmKP tenham sido associadas amplamente com a hipervirulência de linhagens de *K. pneumoniae* (LEE et al., 2017; SHON; BAJWA; RUSSO, 2013; STRUVE et al., 2015), observou-se que a interação com os anticorpos e o sistema complemento dos hospedeiros não influenciam de forma significativa em sua patogenicidade quando comparadas com linhagens não hmKPs (DELEO et al., 2017; HSU et al., 2011; SOTO et al., 2016). Nosso trabalho corrobora com essa hipótese uma vez que tanto nossas linhagens não hmKP, quanto hmKP apresentaram resistência a soro e sangue humano, sem diferença entre as linhagens (Figura 13/14). Observou-se apenas que ambas as linhagens se recuperaram e cresceram mais em soro humano, o que pode ser explicado pelo fato de o sangue humano conter outras proteínas e substâncias que

participam da resposta imune do hospedeiro, e o soro ter apenas o sistema complemento (DELEO et al., 2017; SOTO et al., 2016).

Por fim, a hipervirulência hoje tem sido associada não apenas pelo fenótipo, mas também pelo genótipo e as características clínicas da infecção. Ela parece ser uma consequência de uma interação complexa de vários determinantes genéticos, em vez de uma característica única oriunda de um gene. Sendo assim, a hipervirulência e hipermucoviscosidade são dois fenótipos distintos (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017; CUBERO et al., 2016; MARTIN et al., 2016). Wu et al 2017 em seu trabalho, definiram uma *K. pneumoniae* hipervirulenta como um isolado com três características microbiológicas: um *string test* positivo, PCR positiva para *rmpA*, e amplificação por PCR do gene de aerobatina (sideróforo), caso as linhagens fossem positivas para 2 das 3 características escolhidas, elas eram consideradas hipervirulentas. Utilizando Wu et al 2017 como referência, temos então em nossa coleção de *K. pneumoniae* cinco linhagens hipervirulentas (Kp 80, Kp 83, Kp 92, Kp 93, Kp 96) (Tabela 5) 14 linhagens hipermucoídes (Figura 11). É uma porcentagem preocupante, visto que essas linhagens apresentam fatores de virulência que possibilitam um maior sucesso na invasão e colonização do hospedeiro. (DE CAMPOS et al., 2018).

Epidemiologia molecular por ERIC-PCR

O ERIC-PCR é um técnica utilizada para análise filogenética, na qual o padrão de sequências ERIC que são altamente conservadas e repetitivas entre as espécies de *Enterobacteriaceae* são analisadas (BAKHSHI; AFSHARI; FALLAH, 2018). Em nossa coleção (Figura 17), apenas dois isolados (87, 88) apresentaram 100% de similaridade genética, apesar de os dois (**KPBSB 87, KPBSB 88**) terem sido isolados de urocultura, o paciente não foi o mesmo, sendo que KPBSB87 foi isolada de um paciente que estava

internado e KPBSB88 foi isolada de um paciente externo ao hospital. Ambos foram isolados na mesma data, sendo assim, pode-se presumir que isolados de *K. pneumoniae* circulam tanto em ambiente hospitalar quanto na comunidade.(KO et al., 2002; LIN et al., 2010).

Ao analisar o dendrograma, pode-se observar que existem quatro grandes ramos dentre os 92 isolados de *K. pneumoniae* analisados (Figura 17). Em nenhum dos grandes ramos foi observada alguma característica específica presente em todos os isolados. Estes resultados sugerem que as características biológicas analisadas nesse trabalho podem ocorrer em qualquer isolado independentemente de sua origem clonal. Assim, a resistência a antimicrobianos por exemplo, não está atrelada apenas ao ambiente hospitalar como também encontra-se na comunidade, tal qual observado por GARZARAMOS et al., 2018.

Os isolados KPBSB27 e KPBSB103 apresentaram 92.9% de similaridade genética apesar de não terem o mesmo perfil genético e terem sido isolados com uma diferença de dois anos, sugerindo um sucesso do primeiro isolado em sobreviver e colonizar o ambiente hospitalar, pois o paciente teve origem externa ao hospital e o KPBSB 103, foi isolado de um paciente internado, sugerindo que o primeiro isolado se manteve no ambiente hospitalar durante o período de 2 anos. Os isolados KPBSB19 e KPBSB63, ambos isolados de pacientes externos ao hospital, também foram coletados com uma diferença de tempo maior que um ano sendo o primeiro isolado em maio de 2015 e o segundo, em junho de 2016 e tiveram uma similaridade de 88.9, corroborando com a hipótese de sucesso de linhagens específicas em colonizaram ambientes hospitalares assim como podem se manter na comunidade, utilizando seus hospedeiros como reservatórios.

Seis isolados (KPBSB 64, KPBSB 65; KPBSB54, KPBSB 72; KPBSB 74 e KPBSB 79) apresentaram uma similaridade genética de 90.9%. Os isolados KPBSB64 e KPBSB65 também não possuíam o mesmo perfil de resistência sendo o isolado KPBSB65 resistente e positivo para o gene *magA* e KPBSB64 sensível, ambos foram isolados de pacientes da comunidade externa ao hospital. A diferença no perfil de resistência pode ser explicada pela transferência genética entre os micro-organismos, inclusive os da própria microbiota do hospedeiro. O mesmo observou-se com os isolados KPBSB54 e KPBSB 72, KPBSB 74 e KPBSB 79(MDR); KPBSB 55 e KPBSB 66 com 89,7% de similaridade e KPBSB 48 e KPBSB 48(MDR). (GHARRAH; MOSTAFA EL-MAHDY; BARWA, 2017; MAGIORAKOS et al., 2012).

As amostras KPBSB 82 e KPBSB 83 foram isoladas do mesmo paciente, porém em datas diferentes, ambas foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, e apresentaram 88.9% de similaridade genética. *K. pneumoniae* por ser um patógeno oportunista acomete principalmente pacientes imunocomprometidos o que provavelmente ocorreu nesse caso dessas amostras. (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

Klebsiella variicola

Assim como *K. pneumoniae*, a *K. variicola* é responsável por inúmeras infecções em humanos, como infecções sanguíneas, infecções do trato urinário e respiratório (MAATALLAH et al., 2014; ROSENBLUETH et al., 2004), além de linhagens multirresistentes terem sido identificadas nos últimos anos (ROSENBLUETH et al., 2004). Esses dados corroboram com nossos resultados (Tabela 7), onde encontramos *K.*

variicola multirresistente, e resistente e isoladas de urocultura, hemocultura e ponta de cateter. Apesar de já ter sido identificado linhagens de *K. variicola* com o fenótipo hipermucoviscoso (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017, GARZA-RAMOS et al., 2015), nenhum de nossos isolados apresentou tal característica, embora uma linhagem tenha apresentado o gene *rmpA*.

K. variicola tem outros fatores de virulência identificados por GRAZA-RAMOS, MAATALLAH et al, em nosso trabalho apenas uma linhagem apresentou produção de biofilme fraco, e nenhuma delas fazem parte do sorotipo capsular K1, mais uma vez sugerindo que o fenótipo hipermucoviscoso não está associado a apenas um gene ou fenótipo, mesmo que esse seja encontrado em outra espécie que não *K. pneumoniae* (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017).

Linhagens de *K. variicola* foram isoladas de sangue humano (MAATALLAH et al., 2014) indicando que coloniza o ser humano eficientemente. Em nossos resultados, a maioria das linhagens sobreviveu ao ser incubada em sangue humano, exceto o isolado Kv 57 (Figura 18A). Provavelmente devido aos outros fatores imunobiológicos encontrados no sangue que promovem a resposta imune do hospedeiro (DELEO et al., 2017);

Todos os isolados sobreviveram e se multiplicaram ao serem incubados em soro humano (Figura 18B) evidenciando seu potencial patogênico. Os estudos em relação a esse patógeno ainda são limitados, embora saiba-se do seu potencial patogênico (GARZA-RAMOS et al., 2018). Outros ensaios que realizamos e que demonstraram o potencial patogênico de *K. variicola* foram os ensaios de invasão e toxicidade em células epiteliais HEp-2 (Figura 19/20). Todos os isolados invadiram e sobreviveram no interior das células epiteliais após 24 horas de infecção. Porém, alguns isolados apresentaram crescimento significativo em relação aos outros, sugerindo que essas linhagens infectam

as células epiteliais de maneira específica a linhagem bacteriana. Os isolados Kv 35 (Hemocultura) e Kv 57 (Ponta de cateter) apresentaram maior multiplicação no interior celular do que Kv 104, que provavelmente não infecta a célula (Figura 19).

Embora os isolados de *K. variicola* aqui analisados invadam as células epiteliais e sobrevivam nelas após 24 horas de infecção, sobrevivendo portanto aos efeitos microbicidas das células, nenhum dos isolados mostrou-se citotóxico para o tipo celular analisado. Cano et al, 2013 especula que o efeito citotóxico de *K. pneumoniae* em células epiteliais do pulmão ocorra devido a produção de membranas externas que entregam toxinas as membranas das células. Apesar das cápsulas serem importantes no papel de citotoxicidade celular, sozinhas não apresentam esse efeito indicando que é necessário uma associação entre cápsula e outros fatores de virulência. Assim, como são semelhantes a *K. pneumoniae*, os resultados de citotoxicidade de *K. variicola* em células HEp-2 sugerem seus fatores de virulência não são tóxicos às células epiteliais utilizadas, o que pode ser um mecanismo de defesa do próprio patógeno, para não iniciar a resposta imune do hospedeiro.

v. Conclusões:

Os dados obtidos demonstraram que:

- As espécies de *Klebsiella spp* são em sua maioria, isolados de urocultura e de origem externa ao hospital
- Doze isolados de *K. pneumoniae* apresentam multirresistência
- Todos os isolados MDR de *K. pneumoniae* apresentaram resistência aos antibióticos da classe das cefalosporinas e fluorquinilonas
- Quatorze isolados de *K. pneumoniae* apresentam o fenótipo hiper mucoviscoso.
- Dezessete isolados têm o gene *rmpA* plasmidial
- A maioria dos isolados apresentou produção de biofilme forte e moderada
- Os isolados de *K. pneumoniae* sobrevivem e crescem em soro e sangue humano

- Oito isolados pertencem ao sorotipo K1, frequentemente encontrado em linhagens virulentas e hipervirulentas
- Quatro isolados apresentaram o gene magA
- Não se observou nenhuma característica específica dentre os isolados que os definam como um clone bacteriano.
- Os isolados de *K. variicola* apresentaram fatores de virulência, como produção de biofilme forte ou moderada, resistência a antimicrobianos
- Os isolados de *K. variicola*, em sua maioria, sobrevivem ao soro e sangue humano
- Embora sobrevivam em células epiteliais HEp-2, os isolados de *K. variicola* não apresentaram efeito citotóxico para as células.
- Em conjunto, os dados demonstraram que existem linhagens de *K. pneumoniae* de elevado potencial patogênico circulando na região geográfica analisada (Distrito Federal), que não apresentaram os marcadores clássicos para hipervirulência.

vi. Referências Bibliográficas

AFKHAMI ARDAKANI, M.; RANJBAR, R. Molecular typing of uropathogenic E. coli strains by the ERIC-PCR method. **Electronic physician**, v. 8, n. 4, p. 2291–2295, 2016.

AMBLER, R.P.; The structure of B-lactamases. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.** B289;321-331, 1980.

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.

ALCÁNTAR-CURIEL, M. D. et al. Association of Antibiotic Resistance, Cell Adherence, and Biofilm Production with the Endemicity of Nosocomial Klebsiella

pneumoniae. **BioMed research international**, v. 2018, p. 7012958, 2018.

ANDERL, J. N.; FRANKLIN, M. J.; STEWART, P. S. Role of Antibiotic Penetration Limitation in. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1818–1824, 2000.

ANDERSON, D. J. et al. Seasonal Variation in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infection on 4 Continents. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 5, p. 752–756, mar. 2008.

ANES, J. et al. Exploring the genome and phenotype of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* Of clinical origin. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, 2017.

ASHAYERI-PANAH, M. et al. Genetic profiling of *klebsiella pneumoniae*: Comparison of pulsed field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 823–828, 2013.

BAGLEY, S. T. Habitat association of *Klebsiella* species. **Infection control : IC**, v. 6, n. 2, p. 52–8, fev. 1985.

BAKHSHI, B.; AFSHARI, N.; FALLAH, F. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR analysis as a reliable evidence for suspected *Shigella* spp. outbreaks. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 529–533, 2018.

BROBERG, C. A.; PALACIOS, M.; MILLER, V. L. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. **F1000prime reports**, v. 6, p. 64, 2014.

CAMPOS, M. A. et al. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Infection and immunity**, v. 72, n. 12, p. 7107–14, dez. 2004.

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

CHENG, N.-C. et al. Recent Trend of Necrotizing Fasciitis in Taiwan: Focus on

Monomicrobial *Klebsiella pneumoniae* Necrotizing Fasciitis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 7, p. 930–939, 1 out. 2012.

CHUNG, P. Y. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 20, p. fnw219, out. 2016.

CLEGG, S.; MURPHY, C. N. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 1, 2 fev. 2016.

CORTÉS, G. et al. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. **Infection and immunity**, v. 70, n. 5, p. 2583–90, maio 2002.

COSTERTON, J. W.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. Biofilm in implant infections: its production and regulation. **The International journal of artificial organs**, v. 28, n. 11, p. 1062–8, nov. 2005.

CUBERO, M. et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007-2013). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 154–160, 2016.

DA FONSECA, T. A. P.; PESSÔA, R.; SANABANI, S. S. Molecular analysis of bacterial microbiota on Brazilian currency note surfaces. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 10, p. 13276–13288, 2015.

DE 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. 617–627, 2016.

DELEO, F. R. et al. Survival of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 in human blood. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, 2017.

DI MARTINO, P. et al. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. **Infection and immunity**, v. 64, n. 6, p. 2266–73, jun. 1996.

DORMAN, M. J.; SHORT, F. L. Genome watch: *Klebsiella pneumoniae*: when a colonizer turns bad. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 384–384, 5 jun. 2017.

FANG, C.-T. et al. A Novel Virulence Gene in *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications. **The Journal of Experimental Medicine J. Exp. Med**, v. 03697900, n. 5, p. 697–705, 2004.

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, 1 ago. 2007.

FANG, C.-T. et al. Rapid and Accurate Determination of Lipopolysaccharide O-Antigen Types in *Klebsiella pneumoniae* with a Novel PCR-Based O-Genotyping Method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 666–675, mar. 2016.

FANG, C. et al. The Function of *wzy*_K1 (*magA*), the Serotype K1 Polymerase Gene in *Klebsiella pneumoniae cps* Gene Cluster. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 8, p. 1268–1269, 2010.

FILIUS, P. M. G. et al. Colonization and resistance dynamics of gram-negative bacteria in patients during and after hospitalization. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2879–86, jul. 2005.

FUZI, M. et al. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. 2016.

GARZA-RAMOS, U. et al. Development of a Multiplex-PCR probe system for the proper identification of *Klebsiella variicola* Microbial genetics, genomics and proteomics. **BMC**

Microbiology, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2015.

GARZA-RAMOS, U. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Klebsiella* spp. isolates causing community-acquired infections. **New Microbes and New Infections**, v. 23, p. 17–27, 2018.

GHARRAH, M. M.; MOSTAFA EL-MAHDY, A.; BARWA, R. F. Association between Virulence Factors and Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* Compared to Nonproducing Isolates. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2017, p. 1–14, 2017.

GUO, Y. et al. Microbiological and Clinical Characteristics of Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* Isolates Associated with Invasive Infections in China. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. February, p. 1–9, 2017.

HAN, H. et al. Optimization of pulse-field gel electrophoresis for subtyping of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 7, p. 2720–2731, 2013.

HENNEQUIN, C. et al. Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2123–2130, 2012.

HOLT, K. E. et al. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Front. Cell. Infect. Microbiol**, v. 8, n. 84, p. 3389–4, 2018.

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

HSU, C. R. et al. The role of *Klebsiella pneumoniae* rmpA in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. **Microbiology**, v. 157, n. 12, p. 3446–3457, 2011.

INSUA, J. L. et al. Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax

moth *Galleria mellonella*. **Infection and immunity**, v. 81, n. 10, p. 3552–65, out. 2013.

IREDELL, J.; BROWN, J.; TAGG, K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 352, p. h6420, 8 fev. 2016.

KAWAI, T. Hypermucoviscosity: An Extremely Sticky Phenotype of *Klebsiella pneumoniae* Associated with Emerging Destructive Tissue Abscess Syndrome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 10, p. 1359–1361, 2006.

KLOOS, W. E.; MUSSELWHITE, M. S. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. **Applied microbiology**, v. 30, n. 3, p. 381–5, set. 1975.

KO, W. C. et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: Global differences in clinical patterns. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, p. 160–166, 2002.

KUEHN, B. M. “Nightmare” Bacteria on the Rise in US Hospitals, Long-term Care Facilities. **JAMA**, v. 309, n. 15, p. 1573, 17 abr. 2013.

LATIFPOUR, M.; GHOLIPOUR, A.; DAMAVANDI, M. S. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in nosocomial and community-acquired urinary tract infections. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 3, 2016.

LEE, C.-R. et al. Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 483, 2017.

LEE, H. C. et al. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: Association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia. **Journal of Internal Medicine**, v. 259, n. 6, p. 606–614, 2006.

- LEE, H. W. et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 1, p. 49–54, 2008.
- LI, B. et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. **Future Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1071–1081, set. 2014.
- LIN, J. C. et al. Nosocomial liver abscess caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 266–269, 2007.
- LIN, Y. T. et al. Bacteremic community-acquired pneumonia due to *Klebsiella pneumoniae*: Clinical and microbiological characteristics in Taiwan, 2001-2008. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 307, 2010.
- MAATALLAH, M. et al. *Klebsiella variicola* is a frequent cause of bloodstream infection in the Stockholm area, and associated with higher mortality compared to *K. pneumoniae*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–21, 2014.
- MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.
- MALEKI, N. et al. Prevalence of CTX-M and TEM β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Patients with Urinary Tract Infection, Al-Zahra Hospital, Isfahan, Iran. **Advanced Biomedical Research**, v. 7, n. 1, p. 10, 2018.
- MARCH, C. et al. Role of Bacterial Surface Structures on the Interaction of *Klebsiella pneumoniae* with Phagocytes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56847, 15 fev. 2013.
- MARTIN, R. M. et al. Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **mSphere**, v. 1, n. 5, 2016.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E. et al. *Klebsiella variicola* and *Klebsiella quasipneumoniae*

with capacity to adapt to clinical and plant settings. **Salud Publica de Mexico**, v. 60, n. 1, p. 29–40, 2018.

PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. [s.d.].

PAN, Y.-J. et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 15573, 23 dez. 2015.

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

PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5873–5884, 2015.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. Bacteriocin typing of *Klebsiella* spp. isolated from different sources. **Zentralblatt fur Hygiene und Umweltmedizin = International journal of hygiene and environmental medicine**, v. 198, n. 3, p. 258–64, fev. 1996.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 589–603, out. 1998.

POMAKOVA, D. K. et al. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: An emerging and under-recognized pathogenic variant. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 6, p. 981–989, 2012.

POTTER, R. F. et al. Population Structure, Antibiotic Resistance, and Uropathogenicity of *Klebsiella variicola*. **mBio**, v. 9, n. 6, p. 1–17, 2018.

PRASHANTH, K. et al. Correlation between biofilm production and multiple drug

resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 333, 2008.

RAFII, F.; SUTHERLAND, J. B.; CERNIGLIA, C. E. Effects of treatment with antimicrobial agents on the human colonic microflora. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 4, n. 6, p. 1343–58, dez. 2008.

ROSEN, D. A. et al. Molecular Variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH Affect Function and Pathogenesis in the Urinary Tract. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 3346–3356, 1 jul. 2008.

ROSENBLUETH, M. et al. *Klebsiella variicola*, A Novel Species with Clinical and Plant-Associated Isolates. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 27–35, 2004.

SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 31–37, 2016.

SEIFI, K. et al. Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 9, n. 1, p. e30682, jan. 2016.

SHON, A. S.; BAJWA, R. P. S.; RUSSO, T. A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 107–18, 15 fev. 2013.

SHU, H.-Y. et al. Genetic diversity of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **Microbiology**, v. 155, n. 12, p. 4170–4183, 1 dez. 2009.

SOTO, E. et al. Interaction of non-human primate complement and antibodies with hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*. **Veterinary Research**, v. 47, n. 1, p. 1–13, 2016.

STRUVE, C. et al. Mapping the Evolution of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*.

mBio, v. 6, n. 4, p. e00630, 21 jul. 2015.

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, 1 set. 2008.

STRUVE, C.; BOJER, M.; KROGFELT, K. A. Identification of a Conserved Chromosomal Region Encoding *Klebsiella pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae and Assessment of the Role of Fimbriae in Pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 11, p. 5016–5024, 1 nov. 2009.

STRUVE, C.; KROGFELT, K. A. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 584–590, jun. 2004.

SU, S. C. et al. Community-acquired liver abscess caused by serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* with CTX-M-15-type extended-spectrum β -lactamase [6]. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 804–805, 2008.

THOMAS, S. et al. The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. **Cancer Research**, v. 77, n. 8, p. 1783–1812, 15 abr. 2017.

TZOUVELEKIS, L. S. et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: An evolving crisis of global dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 682–707, 2012.

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

WOLF, B. et al. Carriage of gram-negative bacilli in young Brazilian children with community-acquired pneumonia. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 5, n. 3, p.

155–9, 2001.

WYRES, K. L. et al. Identification of Klebsiella capsule synthesis loci from whole genome data. **Microbial genomics**, v. 2, n. 12, p. e000102, dez. 2016.

XU, H. et al. eGFR and the risk of community-acquired infections. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 9, p. 1399–1408, 2017.

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, 2017.

YAO, B. et al. Clinical and molecular characteristics of multi-clone carbapenem-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) Klebsiella pneumoniae isolates in a tertiary hospital in Beijing, China. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 37, p. 107–112, 2015.

YEH, K.-M. et al. Capsular Serotype K1 or K2, Rather than magA and rmpA, Is a Major Virulence Determinant for Klebsiella pneumoniae Liver Abscess in Singapore and Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 466–471, 1 fev. 2007.

YU, W.-L. et al. Association between rmpA and magA Genes and Clinical Syndromes Caused by Klebsiella pneumoniae in Taiwan. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 10, p. 1351–1358, 2006.

YU, W. L. et al. Low prevalence of rmpA and high tendency of rmpA mutation correspond to low virulence of extended spectrum β -lactamase-producing klebsiella pneumoniae isolates. **Virulence**, v. 6, n. 2, p. 162–172, 2015.

ZÄHLLER, J. et al. Transmission Electron Microscopic Study of Antibiotic Action on. **Society**, v. 46, n. 8, p. 2679–2683, 2002.

