



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Biologia Celular – CEL
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

**Avaliação do papel da hiper mucoviscosidade na patogenicidade de
uma linhagem de *Klebsiella pneumoniae* K64 XDR causadora de
bacteremia.**

Aluna: Isabela Felix Alencar de Sousa

Orientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins

Brasília, Fevereiro de 2020

Isabela Felix Alencar de Sousa

Avaliação do papel da hiper mucoviscosidade na patogenicidade de uma linhagem de *Klebsiella pneumoniae* K64 XDR causadora de bacteremia.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília para obtenção de título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana Amabile de Campos

Brasília - DF

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Avaliação do papel da hiper mucoviscosidade na patogenicidade de uma linhagem de *Klebsiella pneumoniae* K64 XDR causadora de bacteremia.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília para obtenção de título de Mestre em Biologia Molecular.

Isabela Felix Alencar de Sousa

Dissertação aprovada em: 18/02/2020

Comissão examinadora:

1º Membro (Presidente): Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins (UnB)

2º Membro: Prof^ª. Dr^ª. Kelly Grace Magalhães (UnB)

3º Membro: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco (UCB)

4º Membro (Suplente): Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Amabile de Campos (UnB)

Dedicatória

“Depois de escalar uma grande montanha se descobre que existem muitas outras montanhas para escalar.” Nelson Mandela

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente. Quem sobrevive é o mais disposto à mudança.” Charles Darwin

Dedico aos meus pais, Solange e Pedro, por serem meus maiores exemplos na vida, meus grandes incentivadores e as pessoas que eu mais amo nesse mundo. Aos meus amigos e familiares por todo apoio e carinho durante a realização deste projeto.

Agradecimentos

Primeiramente, eu agradeço à Deus pela minha vida, saúde e disposição para realização deste projeto. Assim como, por ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho que me amam e me dão apoio diariamente.

Aos meus pais, Solange e Pedro, por me amarem e me defenderem por quem eu sou, me ensinando que eu devo ser respeitada, assim como devo respeito ao próximo. O que eu conquistei até hoje foi fruto do meu trabalho e dedicação, mas foi principalmente graças à vocês. Por sempre me apoiarem e por me proporcionarem a melhor educação possível para que eu consiga alcançar os meus sonhos. Obrigada por todo carinho e cuidados, por fazerem de tudo para que eu esteja feliz. Sou muito grata por tê-los como meus pais e meu amor por vocês é imensurável.

Aos meus familiares, avôs, avós, tios, tias, primos, primas pelo amor e carinho durante toda a minha vida.

À minha melhor amiga Bibis e à toda sua família, por estarem sempre presentes em momentos importantes, com muito amor e carinho. Sis, obrigada por ser minha irmã do coração, sou muito feliz em ter você comigo durante todos esses anos, te amo imensamente.

À Mari por tantas experiências maravilhosas que eu não poderia escolher ninguém melhor para viver comigo. Juntas nós nos descobrimos, nos amamos e construímos uma amizade que é imprescindível na minha vida. Amo você, Ranyinha.

Aos meus amigos Andrei, Luíza e Ana por estarem comigo desde o colégio, junto com a Bibis, e por compartilharmos tantos momentos incríveis. Ao Chico, ao Marquinhos e à Stefs por serem meus grandes presentes da graduação para a vida, junto com a Mari. À Monique por me ouvir e me ajudar em tantas ocasiões e pela amizade que compartilhamos. Vocês todos são minha segunda família, eu os amo muito.

À Ana e à Laura que tanto me ensinaram e me ajudaram durante o mestrado, além de terem se tornado grandes amigas que eu quero para sempre na minha vida. Muitas risadas foram compartilhadas e nos dias em que tudo dava errado no laboratório, vocês estavam lá para me ouvir e me apoiar. Amo vocês.

À Prof^a. Dr^a. Tatiana por sempre estar presente para me ajudar no que fosse necessário, até com milhares de quilômetros de distância e fuso horário. Sempre com muita paciência e positividade. Obrigada por tantos ensinamentos durante esses anos, sua orientação foi indispensável para a elaboração desse projeto e tornou meu trabalho muito mais fácil e prazeroso. Ao Prof. Dr. Vicente por todo apoio e disponibilidade para me auxiliar durante esse período. Eu não poderia ter pedido por orientadores melhores, agradeço pela confiança, pelo acolhimento no laboratório e por tanto que eu aprendi com vocês.

À Nay, à Rafa, à Lets, ao Luís, ao Anderson, ao Herick e à todos os colegas do LAMP e do corredor por toda assistência e pelos conhecimentos compartilhados durante esses anos. À Prof^a. Dr^a. Kelly, ao Pasqua e aos demais colegas do LIMI pela colaboração em tantos experimentos. Assim como à todos os colegas de outros laboratórios, técnicos e professores que de alguma forma colaboraram para a minha formação e para a elaboração deste projeto.

Às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPDF pelo auxílio financeiro prestado. Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília por possibilitar a realização deste trabalho.

Resumo

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria Gram-negativa encapsulada que normalmente afeta pacientes imunocomprometidos. Na década de 1980, uma nova variante foi descoberta e chamada de hipervirulenta (hvKP). Esta é caracterizada por causar abscessos hepáticos em pessoas consideradas saudáveis, além de poderem se espalhar metastaticamente e de apresentarem o fenótipo de hipermucoviscosidade (hmv). Este pode ocorrer devido à expressão dos reguladores *rmpA* e/ou *rmpA2*, e é detectado por um *string test* positivo. Uma linhagem de *K. pneumoniae* (Kp 34) isolada de um paciente com bacteremia em Brasília apresentou extensiva resistência à antibióticos (XDR) e alta virulência, apesar de ser considerada atípica por não apresentar sorotipo capsular K1 ou K2 e não possuir os genes *rmpA* e *rmpA2*. O foco deste trabalho foi avaliar o papel da hipermucoviscosidade na patogênese de Kp 34 através de mutagênese com o transposon TnPhoA. 100 mutantes foram obtidos e analisados em relação à presença do fenótipo hmv, aqueles não hipermucoviscosos foram selecionados e avaliados com relação à sua curva de crescimento, presença de cápsula, produção de biofilme, sobrevivência em sangue e soro humanos, sobrevivência em células HEp-2 e citotoxicidade, indução da produção de NO e de PPAR- γ por essas células. Além disso, AP-PCRs seguidas de sequenciamento foram realizadas para identificar os possíveis genes interrompidos durante a mutagênese. Os resultados nos mostraram que a perda do fenótipo hmv afetou a capacidade dos mutantes em produzir biofilme e em sobreviver em sangue humano. Assim como afetou a capacidade de células HEp-2 infectadas de induzir a produção de NO. Porém, o fenótipo hmv não aparenta ser crucial na interação dessa linhagem com células epiteliais, pois os mutantes foram capazes de sobreviver mais no interior dessas células, além de serem mais citotóxicos do que Kp 34. Genes relacionados ao transporte de sideróforos e de ferro, transportadores ABC, sistemas de efluxo, proteínas ligadoras de ATP, sistema de secreção do tipo II e L-Fucose isomerase podem ter sido interrompidos durante a mutagênese, afetando assim a expressão do fenótipo de hipermucoviscosidade.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*, patogenicidade, hipervirulência, hipermucoviscosidade.

Abstract

Klebsiella pneumoniae is an encapsulated Gram-negative bacteria that can normally cause infections in immunocompromised patients. By the 1980s, a new variant called hypervirulent was discovered. This strain is able to cause liver abscesses in healthy individuals, is capable of metastatic spread and normally presents a hypermucoviscous phenotype (hmv). The hmv phenotype generally occurs due to the expression of the regulators *rmpA* and/or *rmpA2* and is detected by a positive string test. A strain of *K. pneumoniae* (*Kp* 34) was isolated from a patient with bacteremia in Brasilia and presented extensive resistance to antibiotics (XDR) and high virulence. However, it was considered atypical because it didn't present capsular serotype K1 or K2, nor the *rmpA* *rmpA2* genes. The focus of this work was to evaluate the role of hypermucoviscosity in the pathogenesis of *Kp* 34 using transposon mutagenesis. A hundred mutants were obtained and analyzed in regard of the presence of hmv phenotype. Those hmv⁻ (not hypermucoviscous) were selected and tested in regard of their growth curves, presence of capsule, biofilm production, survival in human blood and serum, survival inside HEp-2 cells and cytotoxicity, production of NO and PPAR- γ by HEp-2 cells. In addition, AP-PCRs followed by DNA sequencing were performed to identify the possible interrupted genes during mutagenesis. The results showed that the loss of the hmv phenotype impacted in the ability of the mutants to produce biofilm and to survive in human blood. In addition, it affected the ability of infected HEp-2 cells to produce NO. On the other hand, this phenotype does not seem to be crucial for the interaction of this strain with HEp-2 cells, because the mutants were able to survive better inside those cells and they were also more cytotoxic to those cells than *Kp* 34. Genes related to the transport of siderophores and iron, ABC transporters, efflux systems, ATP binding-proteins, type II secretion systems and L-Fucose isomerase could have been interrupted and impacted in the expression of hmv phenotype.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, pathogenicity, hypervirulence, hypermucoviscosity.

Lista de Figuras

Figura 1. <i>String test</i> positivo em <i>Klebsiella pneumoniae</i> hiper mucoviscosa	Página 21
Figura 2. Comparação entre os plasmídeos pVLPK (vermelho) e pVir-CR-HvKp4 (azul).	Página 24
Figura 3. Mapa epidemiológico de hvKP.	Página 28
Figura 4. Papel da cápsula na virulência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	Página 32
Figura 5. Papel do LPS na virulência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	Página 35
Figura 6. Papel das fimbrias na virulência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	Página 37
Figura 7. Sideróforos em <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	Página 39
Figura 8. Ação de PPAR- γ na regulação da expressão de genes alvo.	Página 51
Figura 9. Curva de crescimento da linhagem selvagem (<i>Kp</i> 34) e dos mutantes (com inserção de TnPhoA) durante 450 min através de quantificação da absorbância à 600 nm.	Página 70
Figura 10. Visualização das linhagens de <i>Klebsiella pneumoniae</i> utilizadas neste estudo após coloração negativa com. tinta nanquim. Aumento: 40x.	Página 71
Figura 11. Avaliação da produção de biofilme em superfície de poliestireno pelos mutantes M14, M45, M48, M67, M68, M84, M87 e M93.	Página 72
Figura 12. Unidades formadoras de colônias (UFCs) recuperadas após 0, 30, 60 e 120min de incubação das linhagens de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em sangue (A) e soro (B) humanos.	Página 74
Figura 13. Unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas após 24h de infecção em células epiteliais HEp-2.	Página 75

Figura 14. Quantificação da produção de NO em uM por células epiteliais HEp-2 infectadas durante 24h pela linhagem selvagem (<i>Kp</i> 34) e pelos mutantes.	Página 76
Figura 15. Viabilidade de células epiteliais HEp-2 infectadas com a bactéria selvagem (<i>Kp</i> 34) e com os mutantes nos tempos de 3h, 6h e 24h.	Página 78
Figura 16. Porcentagem de células positivas para PPAR- γ .	Página 80
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos das PCRs com primers arbitrários e com primers específicos para as extremidades do transposon.	Página 81

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados para identificação do sítio de inserção do transposon TnPhoA.	Página 66
Tabela 2. Primers utilizados para identificação do sítio de inserção de TnPhoA por meio de PCR: <i>round 1</i> .	Página 67
Tabela 3. Primers utilizados para identificação do sítio de inserção de TnPhoA por meio de PCR: <i>round 1</i> .	Página 67
Tabela 4. Quantidade de amostra de DNA para sequenciamento.	Página 68
Tabela 5. Quantificação da produção de biofilme em superfície de poliestireno pelas linhagens Kp 34 (selvagem), M14, M45, M48, M67, M68, M84, M87 e M93.	Página 73
Tabela 6. <i>Screening</i> inicial de proteínas relacionadas a possíveis genes interrompidos durante a mutagênese.	Página 83/84

Abreviaturas

AP-PCR: Arbitrary primed PCR

CA-PLA: Abscessos hepáticos adquiridos na comunidade

CO₂: Dióxido de carbono

cKP: *K. pneumoniae* clássica

CTX-M: β-lactamase do tipo cefotaximase

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ESBL: β-lactamases de espectro estendido

hBDs: Peptídeos antimicrobianos

HEp-2: Células epiteliais do tipo 2

hmKP: *Klebsiella pneumoniae* hipermucoviscosa

hmv: Hipermucoviscosidade

HUB: Hospital Universitário de Brasília

hvKP: *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta

hv/hmKP: *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta e hipermucoviscosa

ICE: Elementos conjugativos integrativos

IgG: Imunoglobulina G

IL: Interleucina

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

KPCs: β-lactamase do tipo carbapenemase

LB: Meio Luria Bertani

LPS: Lipopolissacarídeos

MBL: Metalo β-lactamases

MOI: Multiplicidade de infecção

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

mRNA: RNA mensageiro

NETs: Armadilhas mediadas por neutrófilos

NDM-1: Nova Delhi Metalo β-lactamase-1

NF- κ β : Fator nuclear κ β
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintase
Omp: Proteína de membrana externa
OXA: beta-lactamase do tipo oxacilinase
PBS: Salina tamponada com fosfato
PCR: Reação de polimerase em cadeia
PPAR: Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PPREs: Elementos responsivos de PPAR
RNA: Ácido ribonucleico
RXR: Receptor retinóide X
SHV: β -Lactamase do tipo SHV
T6SS: Sistema de secreção do tipo VI
TEM: β -lactamase do tipo TEM
TLR: Receptor *Toll-like*
TNF- α : Fator de necrose tumoral α
tRNA: RNA transportador
UFC: Unidades Formadoras de Colônias
UV: Ultravioleta
XDR: Extensivamente resistente à antibióticos

Sumário

I. Introdução	17
<i>Klebsiella spp.</i>	17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
<i>K. pneumoniae</i> hipervirulentas.....	20
Fatores de virulência de <i>K. pneumoniae</i>	30
Cápsula.....	30
Lipopolissacarídeos.....	33
Fímbrias.....	36
Sideróforos.....	38
Proteínas de membrana externa.....	41
Bombas de efluxo.....	42
Sistemas de secreção do tipo VI (T6SS).....	43
Biofilme.....	43
Metabolismo de Alantoína.....	43
<i>K. pneumoniae</i> e a resistência a antibióticos.....	44
Diagnóstico de infecções causadas por <i>K. pneumoniae</i>	49
Tratamento de infecções causadas por <i>K. pneumoniae</i>	50
PPAR- γ	51
II. Justificativa	55
III. Objetivos	56
IV. Materiais e Métodos	57
1. Isolamento, cultivo e armazenamento das linhagens bacterianas.....	58
2. Obtenção de mutantes.....	58
3. Teste de hipermucoviscosidade.....	59
4. Curva de crescimento.....	60

5. Coloração da cápsula com tinta nanquim.....	60
6. Quantificação da produção de biofilme em superfície de poliestireno.....	60
7. Sobrevivência bacteriana em sangue e soro humanos.....	61
8. Linhagem de células epiteliais HEp-2.....	62
9. Cultivo de células epiteliais HEp-2.....	62
10. Sobrevivência bacteriana no interior de células epiteliais HEp-2.....	62
11. Quantificação da produção de NO por células epiteliais HEp-2 infectadas.....	63
12. Teste de viabilidade de células epiteliais HEp-2 após infecção.....	64
13. Citometria de fluxo PPAR- γ	64
14. Identificação do sítio de inserção do transposon TnPhoA.....	65
15. Sequenciamento.....	67
16. Análise de dados.....	68
V. Resultados.....	69
1. Mutagênese e teste de hiper mucoviscosidade.....	69
2. Curvas de crescimento.....	69
3. Coloração com tinta nanquim para avaliar a presença da cápsula polissacarídica.....	70
4. Quantificação da produção de biofilme em superfície de poliestireno.....	71
5. Sobrevivência bacteriana em sangue e soro humanos.....	73
6. Sobrevivência bacteriana no interior de células epiteliais HEp-2.....	74
7. Quantificação da produção de NO por células epiteliais HEp-2 infectadas.....	75
8. Avaliação da viabilidade de células epiteliais HEp-2 após infecção.....	77
9. Quantificação da expressão de PPAR- γ por citometria de fluxo.....	79
10. Identificação do sítio de inserção do transposon TnPhoA.....	80

VI. Discussão	85
Mutagênese e teste de hipermucoviscosidade.....	85
Curvas de crescimento.....	86
Presença da cápsula polissacarídica.....	87
Produção de biofilme.....	88
Sobrevivência em sangue e soro humanos.....	89
Sobrevivência e citotoxicidade em células epiteliais HEp-2 e produção de NO por HEp-2.....	90
Expressão de PPAR- γ por células epiteliais HEp-2.....	94
Screening inicial dos possíveis genes relacionados ao fenótipo de hipermucoviscosidade.....	95
VII. Conclusões	99
VIII. Referências Bibliográficas	100

I. Introdução

Klebsiella spp.

Klebsiella é um gênero de bactérias pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Este gênero é composto por bacilos Gram-negativos, encapsulados, sem motilidade e com colônias de aspecto mucóide (PODSCHUN; ULMANN, 1998) (PACZOSA; MECSAS, 2016) (MARTIN; BACHMAN, 2018). Estes bacilos podem ser encontrados em diversos habitats na natureza, como no solo, na água, na superfície de plantas e na mucosa de mamíferos (BAGLEY, 1985) (POMAKOVA *et al.*, 2011). *Klebsiella* também pode ser encontrada de forma transiente na pele de humanos (KLOOS; MUSSELWHITE, 1975). Isso faz com que este gênero seja bem semelhante à *Enterobacter* e *Citrobacter*, mas diferente de *Shigella* e *Escherichia coli* que não são comumente encontrados no meio ambiente (PODSCHUN; ULMANN, 1998).

O gênero *Klebsiella* é dividido em diversas espécies, as quais podem ser diferenciadas com base em testes bioquímicos e moleculares. *Klebsiella pneumoniae* é a espécie mais relevante para saúde pública. Esta é responsável por causar grande parte das infecções nosocomiais provocadas por este gênero, seguida de *Klebsiella oxytoca* (PODSCHUN; ULMANN, 1998).

Klebsiella pneumoniae

K. pneumoniae foi descrita inicialmente em 1882, quando isolada de pulmões de pacientes com pneumonia, por Carl Friedlander. Devido à isso, foi inicialmente chamada de bacilo de Friedlander (SHON; BAJWA;RUSSO, 2013).

Esta espécie é composta por patógenos oportunistas, mais comumente associados com infecções hospitalares que afetam pacientes imunocomprometidos, em que muitos deles possuem doenças subjacentes como diabetes mellitus, doença pulmonar crônica, doença hepática crônica, assim como pacientes que passaram por transplante de órgãos ou foram submetidos à dialise e alcoolistas (PODSCHUN; ULMANN, 1998) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Essas doenças são fatores de risco provavelmente por causarem supressão no sistema imunológico do hospedeiro,

principalmente em relação à resposta inata (PACZOSA; MECSAS, 2016). Além disso, pessoas idosas e neonatos compõem grupos de risco para infecções com *K. pneumoniae*. No caso de neonatos, o sistema imunológico ainda está se desenvolvendo e a microbiota normal se estabelecendo, além do trato gastrointestinal apresentar uma alta permeabilidade (HODGSON *et al.*, 2014). Estes fatores em conjunto fazem com que este patógeno seja a principal causa de sepse nesta população (AFROZA, 2006). Em relação à pessoas idosas, estas compõem o grupo de risco para infecções com *K. pneumoniae* devido à mudanças em seu sistema imunológico que as torna menos eficientes no controle de infecções (BOYD; ORIJUELA, 2011). Além disso, a introdução de equipamentos médicos como cateteres e tubos endotraqueais facilitam a entrada de *K. pneumoniae* no organismo, assim como a formação de biofilme (ZOLFAGHARI; WYNCOLL, 2011) (CHATTERJEE *et al.*, 2014) (PACZOSA; MECSAS, 2016).

K. pneumoniae encontrada no ambiente é muito similar com isolados de hospitais com relação à bioquímica, virulência e patogenicidade. Mas os isolados de hospitais tendem a ser menos suscetíveis à antibióticos devido à pressão seletiva existente nesses locais (MATSEN; SPINDLER; BLOSSER, 1974). A frequência de colonização também está relacionada com o tempo de internação no hospital e com o uso de antibióticos. Quanto mais tempo uma pessoa fica hospitalizada, mais chances esta possui de ser colonizada com *K. pneumoniae*. Além disso, o uso de antibióticos por um longo período de tempo elimina bactérias sensíveis, mas acaba selecionando bactérias resistentes e com isso, aumenta o risco de adquirir uma infecção (SELDEN *et al.*, 1971) (HAVERKORN; MICHEL, 1979) (TAUR *et al.*, 2013). Uma alta taxa de colonização da mucosa de humanos, principalmente do trato gastrointestinal e da orofaringe está associada com o uso contínuo de antibióticos em ambiente hospitalar (PODSCHUN; ULMANN, 1998).

É importante ressaltar que tradicionalmente *K. pneumoniae* é considerada uma bactéria comensal ou um patógeno oportunista, ou seja, nem todos os isolados que estão colonizando humanos vão causar doenças (LAU; CLEGG; MOORE *et al.*, 2008) (MARTIN *et al.*, 2016). Não se sabe ao certo como ocorre a progressão de colonização para infecção, mas esta está associada com o estado de saúde do

hospedeiro e com genes de virulência da bactéria (MARTIN; BACHMAN, 2018). Além disso, a colonização com *K. pneumoniae* na microbiota está relacionada com o desenvolvimento de infecções, como é relatado em estudos que mostram que *K. pneumoniae* presente na microbiota intestinal predispõe o hospedeiro à infecções (FUNG *et al.*, 2012). Assim como colonização na orofaringe aumenta o risco de pneumonia (PAPAKONSTANTINO *et al.*, 2014).

K. pneumoniae clássicas (cKP) são aquelas capazes de causar infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, raramente afetando indivíduos saudáveis (com exceção de infecções no trato urinário). Estas infecções incluem pneumonia, bacteremia, meningite, sepse, infecções no trato urinário, infecções no tecido mole e infecções abdominais (POMAKOVA *et al.*, 2011) (PACZOSA; MECSAS, 2016) (MARTIN; BACHMAN, 2018). cKP são conhecidas por causar pneumonias adquiridas na comunidade, principalmente em alcoolistas, o que ainda é comum na África e na Ásia, mas não ocorre com frequência na América do Norte e Europa (KO *et al.*, 2002) (POMAKOVA *et al.*, 2011).

A forma de transmissão mais comum ocorre de pessoa para pessoa, principalmente entre pessoas que trabalham em hospitais e pacientes. Mas também pode ocorrer através de superfícies e instrumentos contaminados (JARVIS *et al.*, 1985) (POMAKOVA *et al.*, 2011).

Estima-se que o genoma *core* de *K. pneumoniae*, aquele que está presente em grande parte dos isolados, codifica para funções celulares básicas e possui conteúdo GC e uso de códons homogêneos, seja composto por cerca de 2 mil genes (HACKER; CARNIEL, 2001) (HOLT *et al.*, 2015). A parte do genoma que varia entre os isolados, possui conteúdo GC e uso de códons diferentes, é chamada de genoma acessório. Esta compõe grande parte dos genes de *K. pneumoniae*, incluindo genes cromossômicos e plasmidiais. Normalmente, é composto por genes que promovem vantagens para a bactéria em situações específicas, como genes de virulência e de resistência à antibióticos. Mas também podem ser compostos por moléculas de DNA egoístas, cujo único objetivo é se espalhar (HACKER; CARNIEL, 2001). Estes genes podem ser adquiridos através de transferência

horizontal, o que é evidenciado pela presença de ilhas genômicas e elementos genéticos móveis, em que a integração ocorre em sítios de tRNA em vários isolados (HACKER; CARNIEL, 2001) (WU et al., 2009) (CHEN et al., 2009) (ZHANG *et al.*, 2011). Genes transferidos horizontalmente podem ser identificados através da análise do conteúdo GC do genoma e análise genômica comparativa (ZHANG *et al.*, 2014).

***K. pneumoniae* hipervirulentas**

Na década de 1980 foram relatados casos de pacientes com abscessos hepáticos piogênicos causados por infecções por *K. pneumoniae* no Círculo do Pacífico Asiático (Taiwan, Coreia, Japão e Vietnam). Estas infecções foram adquiridas na comunidade, diferente de infecções com cKP que normalmente ocorrem em hospitais (MARTIN; BACHMAN, 2018). Esses pacientes não apresentavam histórico de doenças hepatobiliares. Além disso, as bactérias possuíam capacidade de se espalhar metastaticamente para outros sítios após a infecção inicial. Estas infecções foram atribuídas à uma nova variante de *K. pneumoniae* denominada hipervirulenta (hvKP) (SHON; BAJWA;RUSSO, 2018).

Infecções causadas por hvKP são caracterizadas por apresentarem abscessos no fígado adquiridos na comunidade (CA-PLA), afetarem pessoas que não possuem histórico de doenças hepatobiliares e possuírem a capacidade de se espalhar metastaticamente. Esta última característica é considerada comum para algumas bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, mas é rara em bacilos entéricos Gram-negativos (SHON; BAJWA;RUSSO, 2018). Surpreendentemente, muitos casos de abscessos no baço, que são um problema raro e pouco relatado, também têm sido atribuídos à infecções com hvKP. O que provavelmente ocorre devido à capacidade da bactéria de se espalhar do fígado para o baço, já que muitos dos pacientes apresentam abscessos em ambos órgãos (LEE; CHOI; KIM, 2011). Outros problemas como endoftalmia (infecção nos olhos), meningite e bacteremia também podem ocorrer devido à infecções com hvKP. Fatores de risco para estas infecções incluem diabetes mellitus, idade entre 55 e 60 anos e ser do sexo biológico masculino (KO *et al.*, 2002) (MARTIN; BACHMAN, 2018).

hvKP é normalmente caracterizada por possuir o fenótipo de hipermucoviscosidade (hmv). Este fenótipo é identificado por um *string test*, que é positivo quando a colônia bacteriana, crescida em ágar sangue, é tocada por uma alça de inoculação e forma uma corda viscosa com comprimento maior que 5 mm. *K. pneumoniae* que possui o fenótipo hmv é chamada de hipermucoviscosa (hmKP) (Figura 1) (FANG et al., 2004) (POMAKOVA et al., 2011) (SHON; BAJWA;RUSSO, 2018).



Figura 1. *String test* positivo em *Klebsiella pneumoniae* hipermucoviscosa. Imagem retirada de Shon; Bajwa; Russo, 2013.

O fenótipo hmv é um fator de virulência importante que está presente em grande parte das hvKP, mas não em todas. Não se sabe ao certo se este é expresso devido à um aumento da quantidade de componentes da cápsula ou se este ocorre devido à polissacarídeos extracapsulares (LI et al., 2014) (SHON; BAJWA;RUSSO, 2018). Mas é importante ressaltar que a aparência mucóide da colônia não indica presença do fenótipo hmv (POMAKOVA et al., 2011). O fator normalmente responsável pela expressão deste fenótipo é o RmpA e/ou RmpA2 (*regulator of the mucoide phenotype*) (SHON; BAJWA;RUSSO, 2018). Este fator pode estar codificado em um gene cromossomal chamado *c-rmpA*, em um gene plasmidial chamado *p-rmpA* ou em um gene plasmidial denominado *p-rmpA2*. RmpA/RmpA2 fazem parte da família UhpA-LuxR de reguladores transcricionais, estes se ligam na região regulatória da extremidade 5' de genes capsulares e realizam uma regulação positiva, aumentando a produção dos polissacarídeos capsulares. RmpA depende de

RcsA e RcsB (*regulation of capsular synthesis*) para realizar sua função de regulação positiva (PACZOSA; MECSAS, 2016). Assim como a expressão de *rmpA* e *rmpA2* é regulada negativamente por Fur (*ferric uptake regulator*). Fur também regula negativamente a transcrição de genes relacionados com a síntese de sideróforos e armazenamento de ferro, então, uma alta concentração de ferro extracelular faz com que ocorra uma regulação negativa da produção de cápsula (CHENG *et al.*, 2010) (WU *et al.*, 2014) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Em hvKP *rmpA* e *rmpA2* estão normalmente presentes em um plasmídeo que contém outros fatores que podem contribuir para a virulência da bactéria, como sideróforos (CHENG *et al.*, 2010). Porém, existem relatos de hmKP que não possuem os genes *rmpA* e *rmpA2*, além de também existirem estudos que descrevem linhagens que possuem estes genes, mas não expressam o fenótipo (CUBERO *et al.*, 2015). Isso significa que outros fatores estão envolvidos na expressão do fenótipo de hiper mucoviscosidade (CATALÁN-NAJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017).

O gene *magA* foi inicialmente associado com o fenótipo de hiper mucoviscosidade, mas é na realidade o gene de polimerase capsular de K1 (*wzy_K1*), ou seja, este contribui para síntese da cápsula. Cada sorotipo capsular possui uma polimerase específica e a deleção deste gene pode impedir a produção de cápsula (FANG *et al.*, 2010) (PAN *et al.*, 2013).

Algumas pesquisas mostraram que hv/hmKP possui concentrações maiores de ácido siálico do que aquelas que não apresentam o fenótipo de hiper mucoviscosidade. Este aumento na concentração permite que essas linhagens sejam mais resistentes à fagocitose quando comparado com aquelas com concentrações menores de ácido siálico ou que não apresentam o fenótipo de hiper mucoviscosidade. Uma diminuição na concentração de ácido siálico pode gerar a perda do fenótipo de hiper mucoviscosidade, diminuindo a resistência à fagocitose por neutrófilos. A resposta imune inata do hospedeiro pode ser inibida pelo ácido siálico através da modulação de respostas inflamatórias (LEE *et al.*, 2014) (CATALÁN-NAJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS CAMACHO, 2017).

Linhagens de hvKP foram sequenciadas e a presença de dois plasmídeos bem similares foi detectada: pK2044 e pLVPK (CHEN *et al.*, 2004) (WU *et al.*, 2009) (RUSSO; MARR, 2019). Diversos fatores de virulência importantes para caracterização de hvKP estão codificados em genes presentes nestes plasmídeos, como *iuc* (sideróforo aerobactina), *peg-344* (transportador metabólico), *rmpA* e *rmpA2* (reguladores transcricionais do fenótipo hipermucóide) (CHENG *et al.*, 2010) (RUSSO *et al.*, 2014) (BULGER *et al.*, 2017) (RUSSO; MARR, 2019). A perda destes plasmídeos pode implicar na diminuição da virulência de linhagens de hvKP (NASSIF *et al.*, 1989). Além disso, uma pesquisa feita com 40 hvKPs isoladas de pacientes com abscessos hepáticos adquiridos na comunidade, mostrou que todas essas linhagens possuíam *iuc*, *iro* (relacionado ao sideróforo salmoquelina), *rmpA* e *rmpA2*. Ademais, grande parte dessas linhagens possuíam pelo menos um dos plasmídeos citados acima (YE *et al.*, 2016) (RUSSO; MARR, 2019). Outro estudo realizado com linhagens de hvKP isoladas de abscessos hepáticos ou pneumonia adquirida na comunidade demonstrou que todas possuíam o plasmídeo pLVPK-like com os genes *iuc*, *iro*, *rmpA* e *rmpA2* (STRUVE *et al.*, 2015) (RUSSO; MARR, 2019). Linhagens de cKP também podem adquirir plasmídeos de virulência, como ocorreu com o plasmídeo pVir-CR-hvKP4 (GU *et al.*, 2018) (RUSSO; MARR, 2019). Este possui uma deleção de *rmpA* e *iro* quando comparado à pLVPK, mas *iuc* e *rmpA2* foram mantidos (Figura 2). Aparentemente, a presença de *rmpA2* conferiu à esta linhagem o fenótipo de hipermucoviscosidade. A ausência de *iro* parece não ter afetado a virulência desta linhagem, mas *iuc* e *rmpA* ou *rmpA2* aparentam ser necessários para o fenótipo de hipervirulência (CHEN *et al.*, 2004) (RUSSO *et al.*, 2014) (RUSSO *et al.*, 2015) (RUSSO; MARR, 2019).

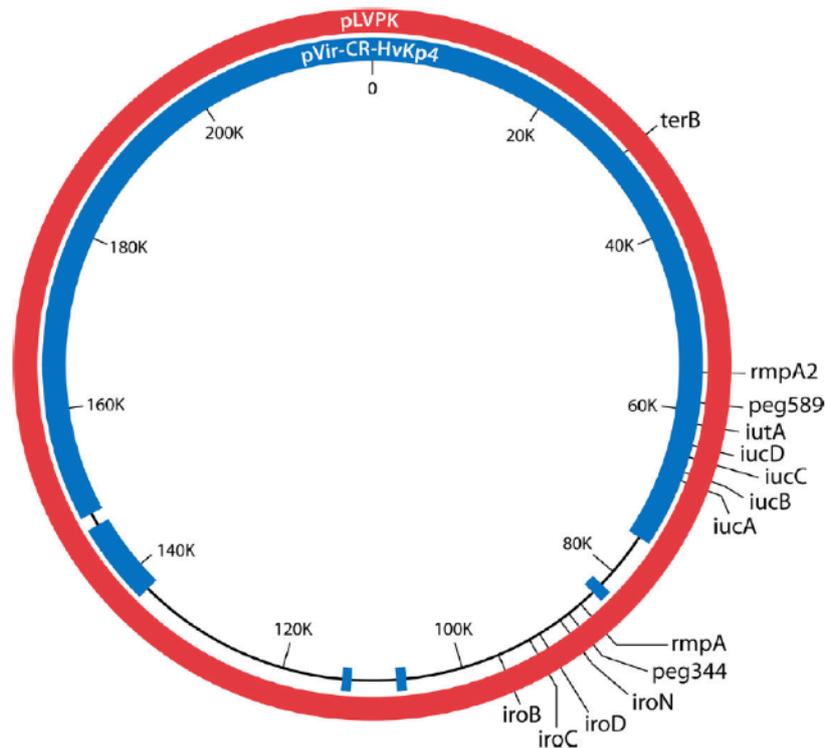


Figura 2. Comparação entre os plasmídeos pLVPK (vermelho) e pVir-CR-HvKp4 (azul). Imagem retirada de Russo; Marr, 2019.

A forma de transmissão mais frequentemente documentada é de pessoa para pessoa (POMAKOVA *et al.*, 2011). Mas dados relacionados à *E. coli* e cKP sugerem que esta também pode ocorrer através de comida ou água contaminadas, além de transmissão entre pessoas e animais (SHON; BAJWA; RUSSO, 2018). O principal local de colonização de hvKP é o trato gastro-intestinal, orofaringe e pele (de forma transiente). Não se sabe ao certo qual a frequência dos indivíduos colonizados que serão realmente infectados pela bactéria, e nem o tempo que essa infecção demoraria para ocorrer. Mas é sabido que a colonização é necessária para que a infecção ocorra, porém esta pode acontecer e não gerar uma infecção (SHON; BAJWA;RUSSO, 2018). Alguns fatores podem estar relacionados com a colonização, como colibactina que é uma genotoxina (substância que pode gerar danos ao DNA) cujos genes biossintéticos estão no *cluster pks* localizados no elemento genético móvel ICEKp10, que também contém genes para yersiniabactina (sideróforo) e microcina E492 (LU *et al.*, 2017) (LAM *et al.*, 2018). A microcina E492 é uma bacteriocina que fica ativa

quando se liga a salmoquelina (sideróforo), esta ligação possibilita que a bactéria alvo capte microcina (LORENZO, 1984) (LAGOS et al., 1993) (LAGOS et al., 2001). Então, hvKP que produz colibactina, microcina e salmoquelina aparentam ter uma vantagem para colonização (RUSSO; MARR, 2019). Mas é importante ressaltar que o cluster *pks* também está presente em algumas linhagens de cKP (STRUVE *et al.*, 2015). Fatores relacionados com a captação de ferro, como Kfu e metabolismo de nitrogênio, como a alantoína, também aparentam ter um papel importante para a colonização do trato gastrointestinal (RUSSO; MARR, 2019). Outro fator que parece ter importância para a colonização é o transportador SAP (*sensitivity to antimicrobial peptides*) (HSU *et al.*, 2019).

Isolados pertencentes ao sorotipo capsular K1 ou K2 e que possuem o fenótipo hmv se mostraram mais virulentos do que aqueles que não possuem este fenótipo (YU *et al.*, 2007). Acreditava-se que o fenótipo hmv esteja associado com sorotipo capsular K1 ou K2, mas linhagens de *K. pneumoniae* hipervirulentas e hiper mucoviscosas (hv/hmKP) de outros sorotipos capsulares foram descritas (FANG *et al.*, 2007) (CUBERO *et al.*, 2015). hmKP pertencentes ao mesmo sorotipo capsular não possuem necessariamente o mesmo padrão de infecção, apesar de possuírem o mesmo perfil de fatores de virulência (QU *et al.*, 2015) (CATALÁN-NAJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017). Além disso, estudos demonstram que a presença do fenótipo de hiper mucoviscosidade não diminui a suscetibilidade das bactérias à antibióticos (POMAKOVA *et al.*, 2011).

Alguns pesquisadores acreditam que a via de entrada do patógeno em nosso organismo seja através de rupturas na pele, como ocorre com *S. aureus* ou invadindo o trato gastrointestinal (POMAKOVA *et al.*, 2011). Mas além de entrar no organismo, a bactéria precisa ser capaz de sobreviver e se multiplicar para gerar uma infecção. Isso depende do inóculo inicial e da virulência das bactérias, mas também da situação de saúde do hospedeiro. Um inóculo bacteriano pequeno pode já ser capaz de gerar infecções, já que o contágio com hvKP acomete pessoas saudáveis (SHON; BAJWA;RUSSO, 2018).

A forma pela qual a bactéria migra do trato-gastrointestinal para outros órgãos ainda não é muito bem elucidada. Baseado em mecanismos utilizados por cKP, as bactérias conseguiriam chegar até a bexiga através do períneo. Um rompimento no intestino também permitiria que as bactérias chegassem até a cavidade peritoneal. A aspiração pela orofaringe levaria as bactérias até o trato respiratório e esses patógenos também poderiam chegar à outros órgãos através de rupturas na pele. Porém, rupturas nestas barreiras biológicas não são comuns em pessoas saudáveis que são infectadas por hvKP (SHON; BAJWA;RUSSO, 2018). Acredita-se que no caso de pneumonia, as bactérias colonizam a orofaringe e são aspiradas para o trato respiratório (KO *et al.*, 2002). No caso de abscessos hepáticos piogênicos (PLA), hvKP pode ser capaz de atravessar a mucosa intestinal mesmo que esta esteja intacta, como ocorre com *Salmonella*, e com isso, chega até o fígado (TU *et al.*, 2009) (FUNG, 2012) (JOHNSON; MYLONA; FRANKEL, 2018). Estudos mostram que um aumento da quantidade de hvKP que está colonizando o trato gastrointestinal é muito importante para a entrada deste patógeno em outros órgãos (LIN *et al.*, 2013). Além disso, o uso contínuo de antibióticos pode aumentar o risco de infecções com hvKP, já que estes selecionariam bactérias resistentes, que estão se tornando cada vez mais comuns (RUSSO; MARR, 2019). Como existem pessoas colonizadas com hvKP no trato gastrointestinal que não desenvolvem infecções, é possível que haja uma entrada alternativa dessas bactérias nesta região (SHON; BAJWA;RUSSO, 2018).

hvKP aparenta ser mais virulenta do que cKP. Em um estudo feito em camundongos, a sobrevivência de hvKP foi muito maior do que a de cKP pois hvKP parece ser mais resistente à mecanismos bactericidas do hospedeiro (POMAKOVA *et al.*, 2011). Outro estudo demonstrou que camundongos infectados com hvKP tiveram um aumento na mortalidade quando comparados com aqueles infectados com cKP (YU *et al.*, 2007). Este aumento na virulência também pode ocorrer pois hvKP têm se mostrado mais resistente à fagocitose mediada por neutrófilos e pelo sistema complemento, além de também resistir mais às armadilhas mediadas por neutrófilos (NETs - *Neutrophil Extracellular Traps*) do que cKP (WANG *et al.*, 2017). Outra possibilidade para explicar esta virulência aumentada é o fato de HvKP aparentar ter um maior crescimento em fluidos corporais quando comparada à cKP (POMAKOVA

et al., 2012). Além de produzir e secretar sideróforos em maior quantidade do que cKP, o que aumenta sua capacidade de sobrevivência pois estas bactérias são mais capazes de resistir à atividade bactericida do sistema complemento (RUSSO *et al.*, 2011).

Esta virulência mais intensa de hvKP pode ter ocorrido por transferência horizontal de genes, já que genes que codificam para fatores de virulência como RmpA (relacionado ao fenótipo de hiper mucoviscosidade) e aerobactina (sideróforo) estão localizados em plasmídeos de virulência que não estão presentes em grande parte das cKP. Mas existem alguns fatores de virulência que estão presentes em ambas, hvKP e cKP, então algumas pesquisas estão focando em tentar descobrir se estes fatores são igualmente importantes para a patogenicidade de ambas ou se algum deles pode contribuir para a virulência aumentada de hvKP (SHON; BAJWA; RUSSO, 2018).

Muitos estudos têm demonstrado uma predileção da infecção de hvKP em pessoas de origem asiática, mas não se sabe ao certo se isso ocorre devido à questões genéticas do hospedeiro que podem torná-lo mais suscetível à infecção ou ao local onde ocorre a exposição ao patógeno (LEE *et al.*, 2016). Além disso, pessoas com diabetes mellitus foram identificadas em muitos estudos como predispostas à infecções por hvKP. O que pode ocorrer devido à presença de altos níveis de glicose no soro, pois a presença de glicose é um sinal do ambiente para aumentar a produção de cápsula (LAI *et al.*, 2003) (LIN *et al.*, 2013) (SHON; MARR, 2019). Mas é importante ressaltar que infecções com hvKP foram reportadas em várias partes do mundo em pessoas de diferentes idades, sendo inclusive frequentemente vistas em jovens saudáveis (LEE *et al.*, 2016) (CATALÁN-NAJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017) (SHON; BAJWA;RUSSO, 2018). Apesar disso, dados mostram uma taxa mais elevada de disseminação de hvKP em países asiáticos, com surtos ocorrendo em Taiwan, China, Coreia do Sul e Irã. Em contrapartida, existem casos relatados em países no ocidente, mas não há relatos de surtos (Figura 3) (LEE *et al.*, 2017).

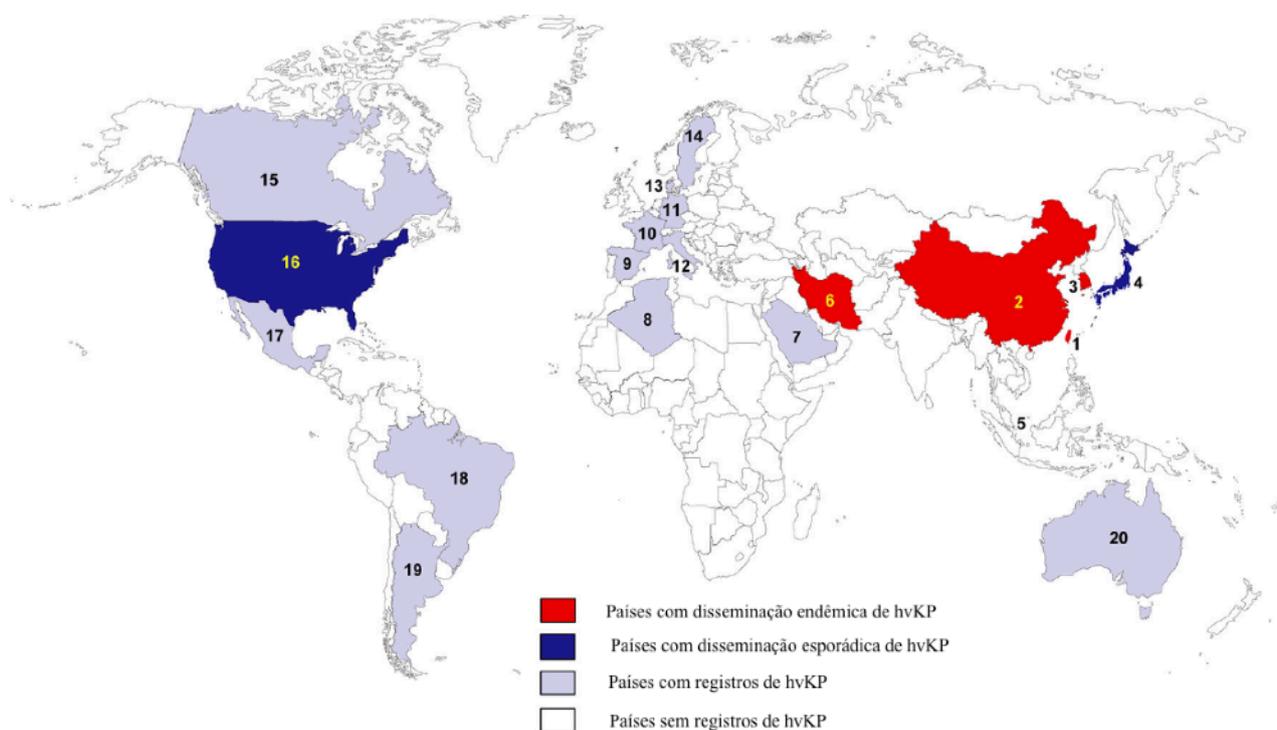


Figura 3. Mapa epidemiológico de hvKP. Países com disseminação endêmica possuem múltiplos surtos de hvKP reportadas na região. Enquanto que aqueles com disseminação esporádica possuem casos relatados, mas sem surtos. Países com registros de hvKP representam àqueles com casos raros. 1 - Taiwan, 2 - China, 3 - Coreia do Sul, 4 - Japão, 5 - Cingapura, 6 - Irã, 7 - Arábia Saudita, 8 - Argélia, 9 - Espanha, 10 - França, 11 - Alemanha, 12 - Itália, 13 - Dinamarca, 14 - Suécia, 15 - Canadá, 16 - Estados Unidos, 17 - México, 18 - Brasil, 19 - Argentina, 20 - Austrália. Imagem adaptada de Lee *et al.*, 2017.

Inicialmente, estudos mostraram que os sorotipos capsulares K1 e K2 estavam mais associados com hvKP e com isso, estes seriam marcadores para identificar bactérias com o fenótipo de hipervirulência e linhagens causadoras de abscessos hepáticos. Além disso, bactérias com sorotipos K1 e K2 aparentam ser mais virulentas do que bactérias de outros sorotipos (PODSCHUN; ULMANN, 1998) (MARTIN; BACHMAN, 2018). Mas atualmente, já é sabido que hvKP pode possuir diferentes sorotipos capsulares, além de existirem relatos de linhagens de cKP que são menos virulentas e possuem sorotipo capsular K1 ou K2. (RUSSO *et al.*, 2011) (POMAKOVA *et al.*, 2011) (SHON; BAJWA;RUSSO, 2018). Então, é importante

ressaltar que o fenótipo de hipervirulência vai além do sorotipo capsular, cKP com sorotipo capsular K1 ou K2 não vai apresentar este fenótipo a não ser que também haja um aumento na produção de polissacarídeos capsulares (fenótipo hmv) e/ou a presença de outros fatores de virulência (RUSSO; MARR, 2019). Além disso, apesar do fenótipo hmv ser um fator de virulência importante para hvKP independentemente do sorotipo capsular, o que vai definir a virulência da linhagem é o genótipo da bactéria. A cápsula é um fator de virulência muito relevante para hvKP, mas genes que codificam para fatores de virulência não capsulares também devem ser levados em consideração (RUSSO *et al.*, 2011). Então, hvKP não pode ser definida apenas pela presença do fenótipo hmv, presença dos genes *rmpA* e *rmpA2* e sorotipo capsular K1 ou K2. Outros fatores de virulência contribuem para a alta patogenicidade de hvKP (POMAKOVA *et al.*, 2011). Além disso, hvKP eram conhecidas como linhagens mais virulentas, normalmente adquiridas na comunidade e mais sensíveis à antibióticos quando comparados à cKP, que são comumente adquiridas em hospitais e resistentes à antibióticos. Porém, relatos mais recentes vêm demonstrado que genes de resistência comuns em cKP e genes de virulência frequentes em hvKP podem ser encontrados no mesmo plasmídeo ou em plasmídeos diferentes, mas no mesmo isolado, o que é extremamente preocupante para a saúde pública e dificulta a diferenciação entre hvKP e cKP (GU *et al.*, 2018) (RUSSO; MARR, 2019). Como *K. pneumoniae* também é capaz de infectar animais, acredita-se que alguns elementos genéticos presentes em hvKP podem ter vindo de um hospedeiro animal (TWHENHAFEL *et al.*, 2008) (JANG *et al.*, 2010) (OSMAN *et al.*, 2014) (ROE *et al.*, 2015) (PINPIMAI *et al.*, 2018) (RUSSO; MARR, 2019).

Atualmente, não existem marcadores completamente eficientes para diferenciar cKP e hvKP, mas características como a presença de alguns biomarcadores clássicos (*iuc* e, *rmpA* ou *rmpA2*), fenótipo de hipermucoviscosidade, presença de um plasmídeo de virulência, complicações clínicas (infecções invasivas adquiridas na comunidade e capacidade de se espalhar metastaticamente em pacientes saudáveis) e/ou demonstrações *in vivo*, em um modelo apropriado, de alta virulência podem auxiliar nesta diferenciação (POMAKOVA *et al.*, 2011) (RUSSO *et al.*, 2018) (RUSSO; MARR, 2019).

Fatores de virulência de *K. pneumoniae*

K. pneumoniae é uma bactéria que possui uma grande variedade de fatores de virulência que permitem que ela cresça e sobreviva no interior do seu hospedeiro, se adaptando à ambientes variados. Os fatores de virulência mais estudados são: Cápsula, lipopolissacarídeos (LPS), fimbrias e sideróforos. Além disso, proteínas de membrana externa, bombas de efluxo, sistemas de secreção do tipo XI, produção de biofilme e genes envolvidos no metabolismo de alantoína também são considerados importantes para a virulência desta bactéria (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Cápsula

A cápsula é formada por polissacarídeos que revestem a célula, estes são os responsáveis por conferir às colônias sua aparência mucóide (PODSCHUN; ULMANN, 1998). Linhagens de *K. pneumoniae* são agrupadas em diferentes sorotipos capsulares, dependendo dos antígenos K presentes em cada uma delas.

Os genes necessários para a produção de cápsula estão localizados no operon *cps* (*capsular polysaccharide synthesis*) presente no cromossomo bacteriano. Estes estão relacionados com a síntese de polissacarídeos, montagem e transporte de componentes capsulares (LI *et al.*, 2014) (PACZOSA; MECSAS, 2016). A extremidade 5' do operon é composta por seis genes conservados (*galF*, *orf2*, *wzi*, *wza*, *wzb* e *wzc*), já a extremidade 3' é composta pelo gene *gnd*. A região central do operon contém sequências que variam de acordo com o sorotipo capsular, estas estão relacionadas à proteínas responsáveis pela polimerização e montagem dos componentes capsulares. A síntese se inicia com a união de unidades repetitivas de sacarídeos, o que ocorre graças a ação de glicosiltransferases. Em seguida, esses sacarídeos são transportados através da membrana interna pela flipase *wzx* e são polimerizados no periplasma pela polimerase *wzy*. Outros genes como *wza*, *wzb* e *wzc* auxiliam no processo de polimerização e transporte dos componentes capsulares. Como o gene *wzy* apresenta algumas variações em sua sequência dependendo do

sorotipo capsular, este pode ser utilizado para identificação de sorotipos através do método de PCR (YEH *et al.*, 2010) (LI *et al.*, 2014).

A cápsula é importante para sobrevivência e multiplicação da bactéria, como é evidenciado em estudos que demonstram que linhagens sem cápsula colonizam, sobrevivem e se espalham menos em camundongos quando comparadas à linhagens encapsuladas, reduzindo assim, a mortalidade dos animais infectados (YOSHIDA *et al.*, 2000) (CORTES *et al.*, 2002) (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Ademais, a cápsula é responsável por proteger a bactéria do sistema imune do hospedeiro, já que diminui a deposição de componentes do sistema complemento na bactéria. Isso ocorre pois C3 é importante para gerar lise bacteriana e para opsonização da bactéria. Como a cápsula diminui a deposição desta opsonina, a interação entre a bactéria e os macrófagos é reduzida, o que consequentemente também diminui a fagocitose. Isso é evidenciado por estudos que demonstram que linhagens sem cápsula se ligaram de forma mais eficiente a C3, quando comparado com linhagens que possuem cápsula. Além disso, linhagens que não sofreram opsonização mas não possuíam cápsula, foram fagocitadas de forma eficiente. O que sugere que exista outro receptor na bactéria, além do fornecido pelo sistema complemento, que pode ser reconhecido pelos macrófagos, mas que a presença da cápsula acaba mascarando. Então, a cápsula também funciona como uma barreira física que impede a interação do macrófago com o receptor (DOMENICO *et al.*, 1998) (CORTES *et al.*, 2002) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Como a cápsula impede a ligação de células imune com a bactéria, a resposta imune do hospedeiro à infecção é reduzida (EVRARD *et al.*, 2010). Além disso, a cápsula também bloqueia a opsonização realizada por anticorpos (CATALÁN-NAJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017). Estudos demonstraram uma menor indução de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6, e uma maior indução de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 quando comparado à bactérias sem cápsula (YOSHIDA *et al.*, 2001) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Ademais, a cápsula é necessária para diminuir a ação de NF- κ B, reduzindo assim a produção de IL-1- β que consequentemente, diminui IL-8. Este por sua vez, é importante para o recrutamento e ativação de neutrófilos (REGUEIRO *et al.*, 2011) (PACZOSA; MECSAS, 2016).

A cápsula também modula a interação da proteína surfactante D com a bactéria, essa proteína é importante para auxiliar no *clearance* bacteriano por macrófagos (OFEK *et al.*, 2000) (CORTES *et al.*, 2002). Além de proteger o patógeno de peptídeos antimicrobianos, como hBDs (*human β defensins*). hBD1 é expresso de forma constitutiva por células epiteliais do trato respiratório, enquanto que hBD2 e hBD3 são induzidos quando ocorre uma infecção por patógenos. A cápsula dificulta a interação da bactéria com receptores TLR (*toll-like receptor*) na célula epitelial, além de estimular a produção de moléculas que regulam negativamente a expressão de hBD (MORANTA *et al.*, 2010) (LI *et al.*, 2014). Outro papel importante da cápsula para auxiliar na evasão do sistema imune é o fato desta prejudicar a maturação de células dendríticas, o que diminui a produção de citocinas pro-Th1, atrapalhando o processo de ativação de células T (Figura 4) (EVRARD *et al.*, 2010) (LI *et al.*, 2014).

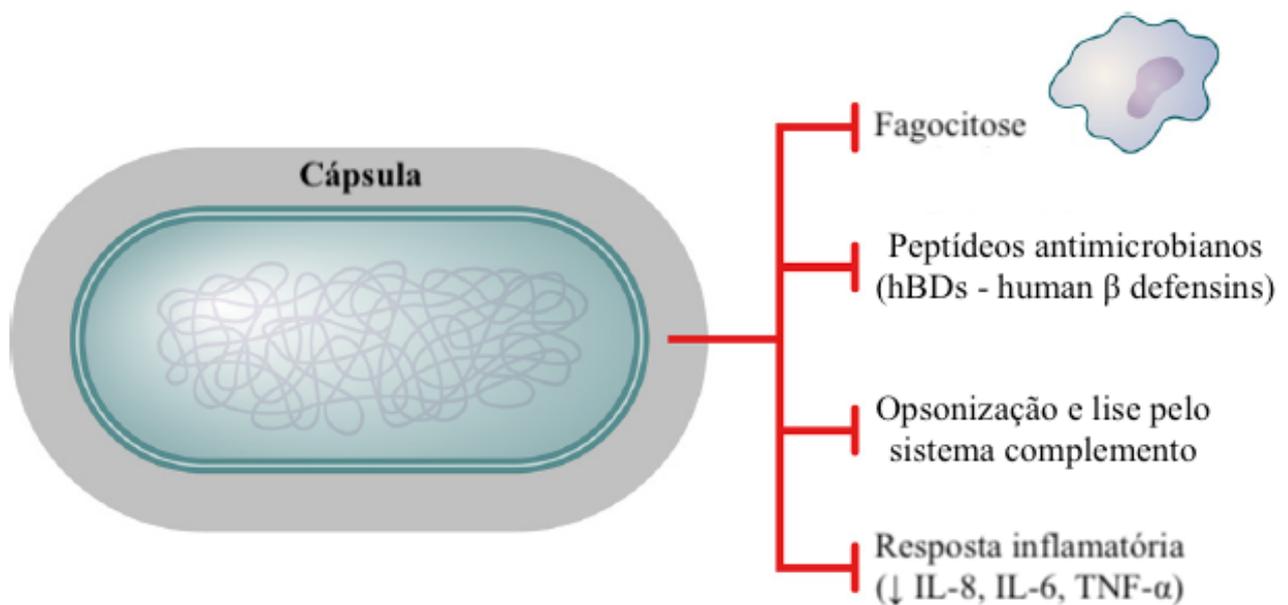


Figura 4. Papel da cápsula na virulência de *Klebsiella pneumoniae*. A cápsula protege à bactéria de fagocitose, peptídeos antimicrobianos, opsonização e lise pelo sistema complemento e da resposta inflamatória, reduzindo os níveis de IL-8, IL-6 e TNF- α . Imagem adaptada de Paczosa; Mecsas, 2016.

No caso de hmKP, ocorre uma maior produção de polissacarídeos capsulares ou de polissacarídeos extracapsulares que contribuem para a formação do fenótipo hipermucoviscoso, e este pode estar relacionado com um aumento da virulência da bactéria em muitos estudos (FANG *et al.*, 2004) (YU *et al.*, 2006) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Normalmente, a expressão deste fenótipo é regulada pelos genes *rmpA* e *rmpA2*, mas outros fatores também estão envolvidos já que existem linhagens hmKP que não apresentam estes genes (CATALÁN-NAJERA; GARZARAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017). Estudos mostraram que linhagens hvKP são mais resistentes à morte mediada por sistema complemento do que cKP, além de resistirem mais à fagocitose por neutrófilos e macrófagos (POMAKOVA *et al.*, 2012).

O conteúdo de manose presente no polissacarídeo capsular pode afetar a virulência da bactéria (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). Um estudo realizado por YU *et al.*, (2007) demonstrou a ausência de manose- α -2/3-manose em sorotipos mais virulentos, e a presença deste componente em sorotipos com menor virulência. Manose- α -2/3-manose é reconhecida por macrófagos que medeiam a fagocitose destas bactérias. Em sorotipos mais virulentos, em que este componente não está presente, macrófagos não o reconhecem e a bactéria não é fagocitada (OFEK *et al.*, 1993). Além disso, em linhagens que possuem manose- α -2/3-manose, a fagocitose é aumentada pela proteína surfactante A, o que não ocorre em linhagens que não possuem este componente (KABHA *et al.*, 1997) (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

Lipopolissacarídeos (LPS)

Lipopolissacarídeos estão presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas. Estes são compostos por antígeno O (*cluster* gênico *wb*), oligossacarídeo central (*cluster* gênico *waa*) e lipídeo A que é responsável por ancorar o LPS na membrana externa (*cluster* gênico *lpx*) (PACZOSA; MECSAS, 2016). O oligossacarídeo central e o lipídeo A são muito conservados, mas existem cerca de 9 tipos diferentes de antígeno O, sendo que O1 é o mais comum (HANSEN *et al.*, 1999).

LPS possui um papel duplo em *K. pneumoniae*, já que são fatores de virulência importantes para a bactéria, mas ao mesmo tempo, são capazes de ativar respostas imunológicas do hospedeiro. O lipídeo A é responsável por se ligar à TLR4 na célula hospedeira, o que desencadeia a produção de citocinas que são importantes no recrutamento e ativação de macrófagos e neutrófilos para combater a infecção bacteriana, além de ser responsável pela ativação de cascatas inflamatórias que podem levar à sepse (BRANGER *et al.*, 2004) (PACZOSA; MECSAS, 2016) (MARTIN; BACHMAN, 2018).

Algumas bactérias possuem a capacidade de modificar a estrutura do lipídeo A, dificultando assim o reconhecimento deste pelas células imune e modulando a resposta inflamatória (LLOBET *et al.*, 2015). Além disso, Clements *et al.* (2007) demonstraram que a acilação do lipídeo A do LPS é importante para a virulência da bactéria, já que mutantes que não possuem a enzima lpxM, responsável por esta modificação, tiveram seu crescimento reduzido em pulmões de camundongos e foram menos letais para estes animais. A ausência desta enzima não afetou a sensibilidade da bactéria em sofrer fagocitose ou a ação do sistema complemento, mas a deixou mais sensível à ação de peptídeos antimicrobianos, provavelmente devido à um aumento da permeabilidade da membrana externa.

Lipopolissacarídeos são muito importantes para conferir resistência ao sistema complemento. A cápsula pode esconder as moléculas de LPS do sistema imune do hospedeiro, o que também pode ocorrer devido à presença da hipercápsula de hmKP, impedindo que o sistema complemento seja ativado (WU *et al.*, 2009) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Outra possibilidade ocorre no caso de LPS que possui o antígeno O com maior comprimento, esta molécula ficará exposta mesmo com a presença da cápsula. Então, o sistema complemento é ativado, mas este não consegue exercer seus efeitos, pois o antígeno O se liga a C3b distante da membrana externa devido ao tamanho do antígeno O e não ocorre formação de C5b. Conseqüentemente, não ocorre opsonização e nem formação de poros na membrana da bactéria (MERINO *et al.*, 1992). Linhagens que possuem LPS com uma estrutura truncada ou que não possuem o antígeno O são mais suscetíveis à ação do sistema complemento, mesmo na presença de cápsula. Pois, o lipídeo O dificulta a ligação de C1q à superfície da

bactéria, o que é importante para impedir a ação do sistema complemento (PACZOSA; MECSAS, 2016). Mudanças ambientais, como diferenças na osmolaridade, podem influenciar no desenvolvimento de moléculas de LPS longas ou truncadas, então uma mesma linhagem pode ser mais suscetível ou mais resistente ao sistema complemento dependendo das condições ambientais onde esta se encontra (Figura 5) (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

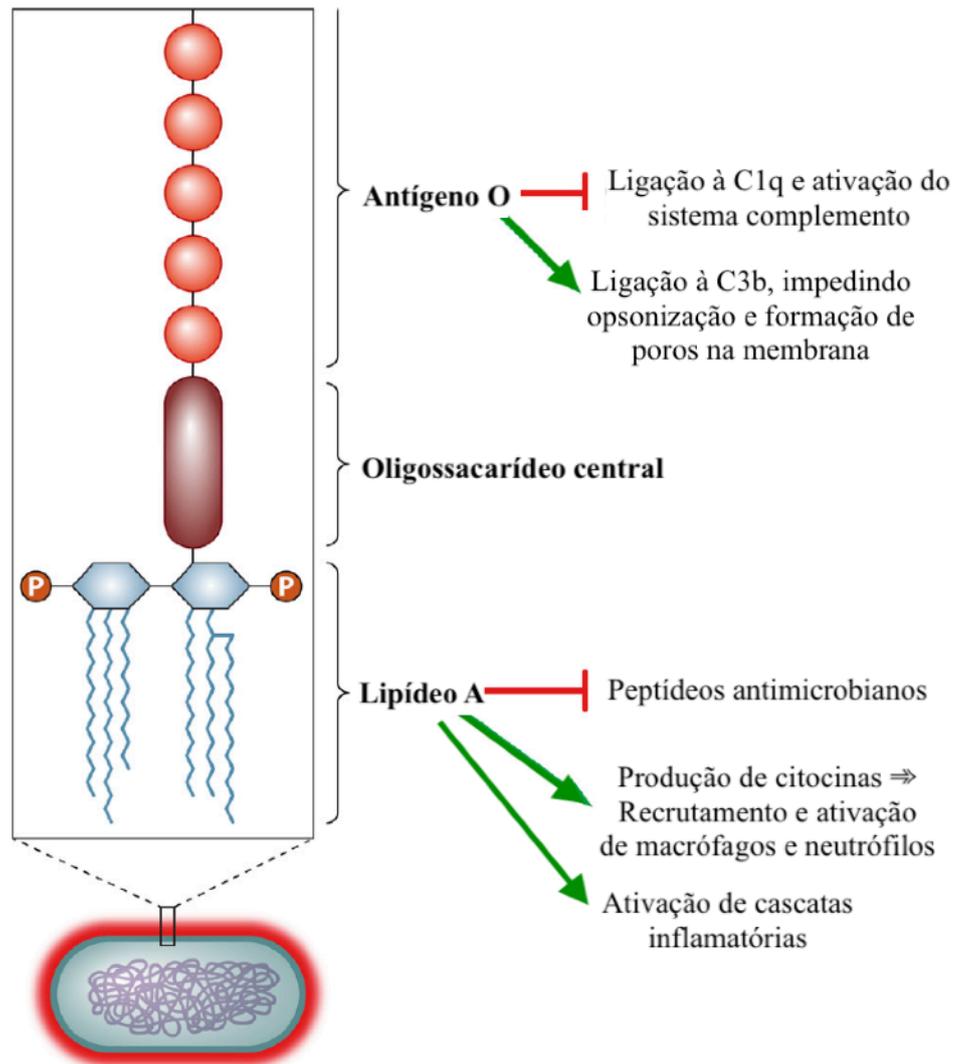


Figura 5. Papel do LPS na virulência de *Klebsiella pneumoniae*. O antígeno O dificulta a ligação de C1q e a ativação do sistema complemento, além de se ligar a C3b impedindo a opsonização e formação de poros na membrana da bactéria. Já o lipídeo A, protege a bactéria da ação de peptídeos antimicrobianos, mas quando se liga à TLR-4 estimula a produção de citocinas que são responsáveis pelo

recrutamento de ativação de macrófagos e neutrófilos. Além disso, este é responsável por ativar cascatas inflamatórias. Imagem adaptada de Paczosa; Meccsas, 2016.

Fímbrias

Fímbrias são estruturas filamentosas proteicas presentes na superfície da bactérias que são importantes para auxiliar na adesão de *K. pneumoniae* à diversas superfícies. As fímbrias do tipo 1 e 3 são as mais estudadas nesta bactéria (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Fímbrias do tipo 1 estão presentes tanto em isolados clínicos, como em isolados ambientais. Grande parte da estrutura destas fímbrias está codificada no gene *fimA*, enquanto que a parte que confere as propriedades de adesão está localizada no gene *fimH*. Esta adesina se liga à glicoproteínas manosiladas (KLINE *et al.*, 2009) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Mas existem outros genes que também são importantes para produção e funcionamento deste apêndice, como *fimF*, *fimG*, *fimC*, *fimI* e *fimK* (PACZOSA; MECSAS, 2016). Estudos realizados com camundongos mostram que fímbrias do tipo 1 são importantes para infecções no trato urinário pois auxiliam *K. pneumoniae* a invadir a bexiga e também na formação de biofilme neste local. Apesar disso, estas não aparentam ter influência na colonização de *K. pneumoniae* no trato gastrointestinal e pulmões (STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2008) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Em contrapartida, outros estudos mostraram que fímbrias do tipo 1 tem sua expressão diminuída em células que fazem parte de biofilme, então estas não influenciariam a produção de biofilme (SCHROLL *et al.*, 2010) (PACZOSA; MECSAS, 2016). A presença de fímbrias do tipo 1 pode facilitar a ligação com células fagocíticas e conseqüentemente, a fagocitose da bactéria, liberação de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de células do sistema imune (MALAVIYA *et al.*, 1996) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Mas em alguns casos, a cápsula dificulta a interação entre fímbrias e essas células imunológicas (Figura 6) (SCHEMBRI *et al.*, 2005) (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Fímbrias do tipo 3 possuem formato de hélice e estão codificadas no *cluster* gênico *mrkABCD* (TARKKANEN *et al.*, 1998) (PACZOSA; MECSAS, 2016). A

maior parte da estrutura está codificada no gene *mrkA* e a adesina no gene *mrkD*. *mrkB*, *mrkC*, *mrkE* são importantes para montagem e regulação da expressão destas fímbrias, enquanto que *mrkF* é importante para conferir estabilidade (ALLEN; GERLACH; CLEGG, 1991) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Estas também estão presentes em grande parte dos isolados de *K. pneumoniae*, mas não se ligam à resíduos de manose, como ocorre com as fímbrias do tipo 1. Acredita-se que fímbrias do tipo 3 se liguem à proteínas da matriz extracelular, como colágeno (SEBGHATI *et al.*, 1998) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Aparentemente, estas fímbrias não são necessárias para colonização do trato gastrointestinal e nem para infecção do trato urinário e pulmões. Mas são muito importantes para formação de biofilme, o que poderia ajudar as bactérias no desenvolvimento de infecções em pacientes com cateteres (STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2009). Porém, estudos *in vitro* demonstraram que fímbrias do tipo 3 são importantes para se ligar à células da traquéia, da boca e à algumas partes do pulmão, o que significa que mais estudos precisam ser feitos para determinar o papel de fímbrias do tipo 3 na patogenicidade de *K. pneumoniae* (Figura 6) (HORNICK *et al.*, 1992).

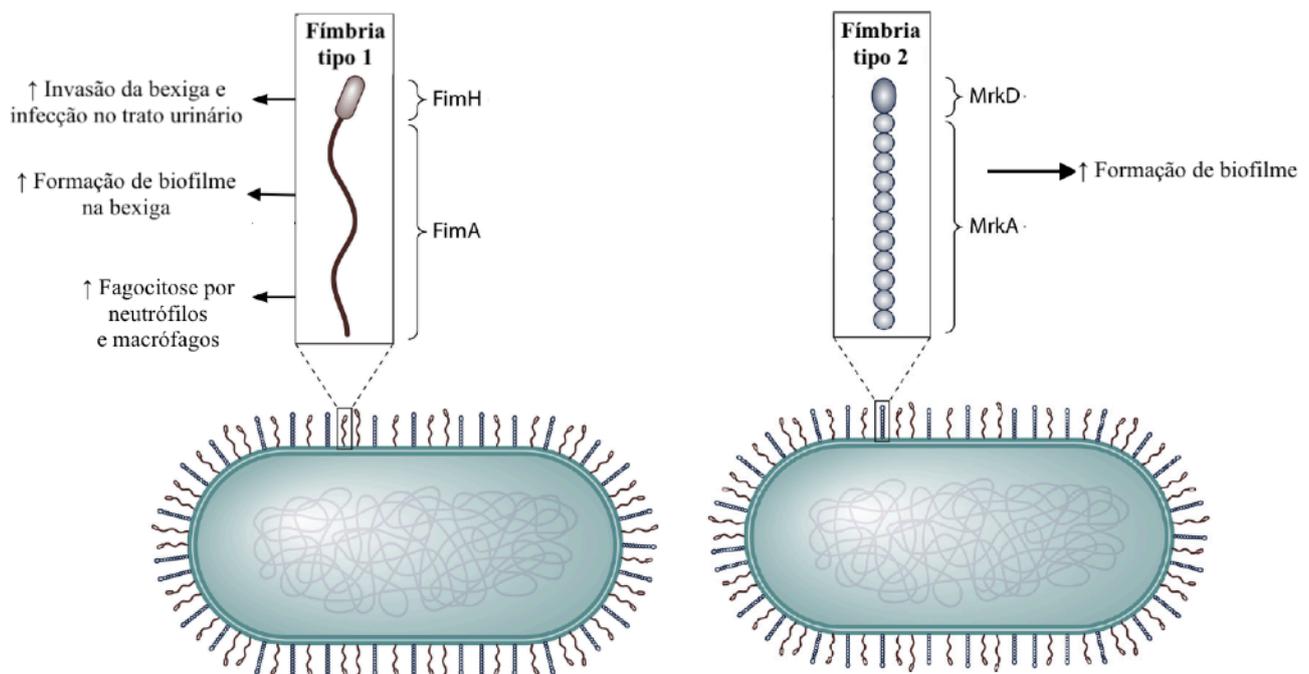


Figura 6. Papel das fímbrias na virulência de *Klebsiella pneumoniae*. Fímbrias do tipo 1 auxiliam na invasão da bexiga e conseqüentemente, na infecção no trato urinário, além de auxiliar a formação de biofilme na bexiga. Porém, estas facilitam a ligação da bactéria com células fagocíticas, ajudando na fagocitose da bactéria por neutrófilos e macrófagos. Já fímbrias do tipo 2, auxiliam na formação de biofilme. Imagem adaptada de Paczosa; Meccas, 2016.

Sideróforos

O crescimento da bactéria é limitado pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, mas também pela quantidade de ferro disponível, já que este funciona como um catalisador redox em diversos processos importantes para o microrganismo (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). Com isso, para que *K. pneumoniae* consiga infectar seus alvos de forma eficiente, esta precisa de mecanismos para adquirir ferro, como a secreção de sideróforos. O ferro está presente em concentrações bem limitadas no hospedeiro, já que células do sistema imune o sequestram para controlar o crescimento de patógenos. Além disso, o ferro presente no plasma normalmente está ligado à proteínas transportadoras de ferro como a transferrina ou lactoferrina (BULLEN; ROGERS; GRIFFITHS, 1972) (PACZOSA; MECCAS, 2016).

Sideróforos são moléculas que são secretadas pela bactéria, se ligam ao ferro com maior afinidade do que proteínas do hospedeiro e retornam ao interior da bactéria utilizando receptores específicos (RUSSO; MARR, 2019). A expressão de vários sideróforos como enterobactina, yersiniabactina, salmoquelina e aerobactina, auxilia esta bactéria a ser mais eficiente durante a colonização de tecidos diversos (Figura 7) (MIETHKE; MARAHIEL, 2007) (PACZOSA; MECCAS, 2016).

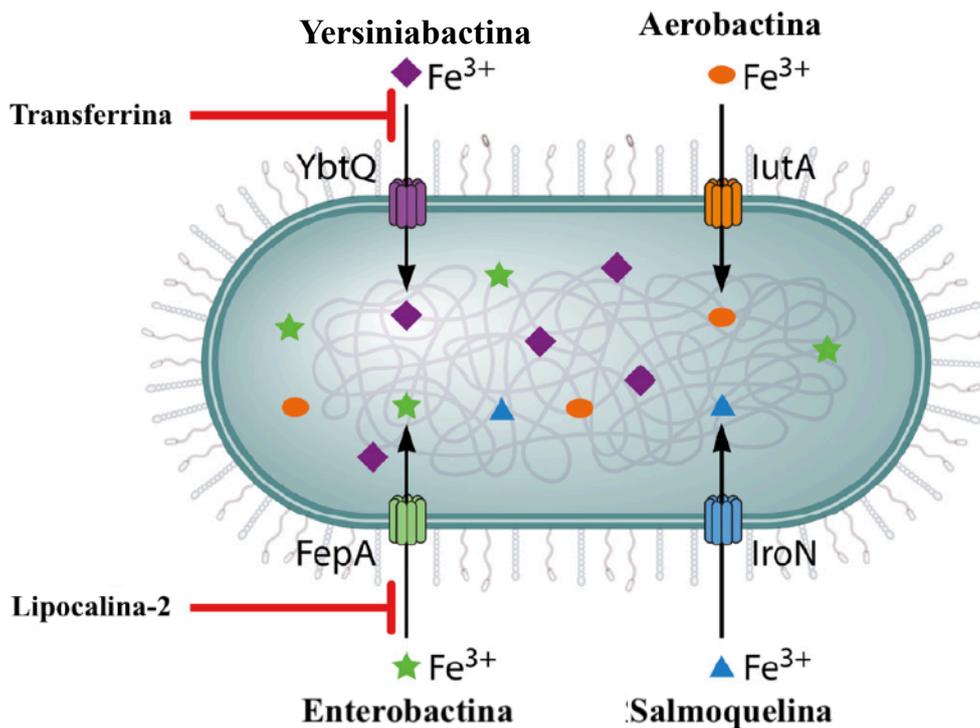


Figura 7. Sideróforos em *Klebsiella pneumoniae*. Transferrina é capaz de inibir a ação de yersiniabactina, assim como lipocalina-2 tem a capacidade de impedir a ação de enterobactina. YbtQ, IutA, IroN e FepA são responsáveis pelo transporte dos sideróforos yersiniabactina, aerobactina, salmoquelina e enterobactina, respectivamente. Imagem adaptada de Paczosa; Mecsas, 2016.

Enterobactina está presente tanto em linhagens de cKP, como em linhagens de hvKP. Os genes responsáveis pela expressão deste sideróforo estão presentes no *cluster* cromossômico *entABCDEF*, enquanto que fatores responsáveis pelo seu transporte estão codificados no *cluster* gênico *fepABCDG* (PACZOSA; MECSAS, 2016). A proteína lipocalina-2, que é expressa de forma basal, mas tem sua expressão aumentada durante infecções, é liberada por diversos tipos celulares para neutralizar a enterobactina e com isso, limitar o crescimento da bactéria, como demonstrado em infecções no trato respiratório (CHAN *et al.*, 2009) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Além disso, essa proteína também aumenta o recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção em uma resposta pró-inflamatória. Então, a expressão de outros sideróforos é necessária para uma infecção efetiva de *K. pneumoniae* na presença de

lipocalina-2 (BACHMAN; MILLER; WEISER, 2009) (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Yersiniabactina é outro sideróforo encontrado em *K. pneumoniae*. Proteínas responsáveis por sua síntese são codificadas pelos genes *irp*, transportadores pelos genes *ybt* e *fyu* e receptor pelo gene *ybtQ* (LAWLOR; O'CONNOR; MILLER, 2007) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Este sideróforo está presente majoritariamente em linhagens hvKP presentes no trato respiratório e não é inibido por lipocalina-2. Porém, transferrina presente no soro impede a captação de ferro por yersiniabactina, com isso, esta não consegue se disseminar pelo sangue. O que também demonstra que a expressão de outros sideróforos é necessária para disseminação de *K. pneumoniae* (BACHMAN et al., 2011) (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Salmoquelina corresponde à enterobactina c-glicosilada, esta modificação ocorre através da expressão de genes presentes no *cluster* gênico *iroA* e é importante pois impede que a lipocalina-2 se ligue à salmoquelina (FICSHBACH et al., 2006) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Seu transportador é codificado pelo gene *iroN*. Este sideróforo está presente com mais frequência em hvKP e pode estar relacionado com a virulência desta, já que possibilita a colonização desta bactéria na nasofaringe de hospedeiros que expressam lipocalina-2 (PACZOSA; MECSAS, 2016). Mas este não parece ser importante para gerar infecções sistêmicas causadas por *K. pneumoniae* (RUSSO et al., 2014).

Aerobactina é o sideróforo mais secretado por hvKP e não é muito encontrado em cKP (RUSSO et al., 2015). Este é normalmente encontrado em linhagens hmKP, o que provavelmente ocorre pois o *cluster* gênico responsável por este sideróforo (*iucABCD*) e seu transportador (*iutA*) estão presentes no mesmo plasmídeo de virulência onde está situado *rmpA*, um dos reguladores transcricionais responsáveis pelo aumento da produção de polissacarídeos capsulares (CHEN et al., 2004) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Este sideróforo aparenta ser o mais importante para que hvKP gere infecções sistêmicas (PACZOSA; MECSAS, 2016). Em um estudo realizado com camundongos, linhagens de *K. pneumoniae* que produzem aerobactina eram mais virulentas do que aquelas que não a produzem. Além disso, muitos dos

pacientes com infecções graves adquiridas na comunidade, estavam infectados com linhagens produtoras de aerobactina (YU *et al.*, 2007). Outro estudo demonstrou um aumento na virulência de uma linhagem antes considerada avirulenta, graças à transferência de um plasmídeo contendo genes para aerobactina e seu receptor (NASSIF; SANSONETTI, 1986).

Estudos sugerem que hvKP possui uma maior capacidade de adquirir ferro do que cKP, o que pode justificar a maior virulência em linhagens hvKP. Então, a capacidade de aquisição de ferro é um fator importante para a virulência de *K. pneumoniae*, diversos sideróforos são secretados por esta bactéria, garantindo que a interrupção de um ou outro gene relacionados à produção de sideróforos não afete a virulência consideravelmente. Apenas quando vários sistemas de aquisição de ferro são afetados que a virulência de hvKP é reduzida (SHON; BAJWA; RUSSO, 2013).

Proteínas de membrana externa

Proteínas de membrana externa, também conhecidas como OMPs, são fatores de virulência importantes para *K. pneumoniae*. Uma delas é a OmpA que é importante para inibir a produção de citocinas e para proteger a bactéria de peptídeos antimicrobianos (LLOBET *et al.*, 2009) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Por outro lado, alguns estudos demonstraram que esta também pode aumentar a produção de citocinas e o recrutamento de neutrófilos (PICHAVANT *et al.*, 2003) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Então mais estudos são necessários para determinar o papel desta proteína para a virulência da bactéria, levando em conta diferentes linhagens que podem apresentar fatores de virulência diversos capazes de modular a inflamação (PACZOSA; MECSAS, 2016). Outras OMPs como Pal (*peptidoglycan-associated lipoprotein*) e LppA (*murein lipoprotein*) se mostraram importantes para o fitness bacteriano, pois estas protegem a bactéria de fagocitose por neutrófilos. Além disso, estas também podem contribuir para integridade da célula bacteriana, protegendo-a de detergentes aniônicos e de alguns antibióticos (HSIEH *et al.*, 2013) (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Porinas também são proteínas de membrana externa que agem como poros que permitem a passagem de algumas moléculas e com isso, podem auxiliar na penetração de antibióticos (KACZMAREK et al., 2006) (SRINIVASAN *et al.*, 2012). Devido à isso, as porinas OmpK35 e OmpK36 não são expressas frequentemente em *K. pneumoniae* resistentes à antibióticos, como aquelas que possuem enzimas ESBL ou KPC (DOUMITH et al., 2009) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Porém, a presença dessas porinas pode ter um impacto na virulência da bactéria protegendo-a da fagocitose por neutrófilos (CHEN *et al.*, 2010) (TSAI *et al.*, 2011) (MARCH *et al.*, 2013) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Estudos mostraram que a deleção da porina *KpnO* resultou em uma menor produção de polissacarídeos capsulares, o que gerou colônias menores e sem aspecto mucóide. Experimentos realizados com *C. elegans* demonstraram que estas linhagens que não possuíam *KpnO* eram menos virulentas do que a linhagem selvagem. A complementação desta deleção recuperou a virulência e o fenótipo de hipermucoviscosidade (SRINIVASAN *et al.*, 2012) (CATALÁN-NAJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS CAMACHO, 2017).

Bombas de efluxo

Bombas de efluxo são importantes para conferir resistência à antibióticos e para virulência de *K. pneumoniae*. Estas também podem ser as responsáveis pela liberação de moléculas utilizadas durante a regulação da expressão de fatores de virulência por *quorum sensing* e para homeostase celular. Além de serem importantes detoxicação da célula bacteriana, eliminando metabólitos (EVANS *et al.*, 1998) (MARTINEZ *et al.*, 2009) (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013).

Estudos demonstraram que a bomba de efluxo AcraB presente em *K. pneumoniae* aumenta o fitness bacteriano nos pulmões de camundongos, provavelmente porque esta aumenta a resistência bacteriana à resposta imune inata (PADILLA et al., 2010) (PACZOSA; MECSAS, 2016). Bialek *et al.* (2010) demonstraram que uma superexpressão de AcraB está relacionada com o aumento da virulência de *K. pneumoniae*.

Sistema de secreção do tipo VI (T6SS)

Este sistema possui a função de injetar moléculas e toxinas em outras células graças à um aparato em formato de seringa que está ancorado na membrana da bactéria. T6SS foi inicialmente identificado em *Vibrio cholerae*, mas também está presente em várias bactérias Gram-negativas como *K. pneumoniae*. Este é importante para permitir que estas bactérias possam competir com outras, além de aumentar o fitness bacteriano (LIU *et al.*, 2017) (MARTIN; BACHMAN, 2018).

Biofilme

Biofilmes são comunidades microbianas envoltas por uma matriz extracelular composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos e que estão aderidas à uma superfície biótica ou abiótica. Estas comunidades são funcionais e possuem caráter multicelular, pois ocorre divisão de tarefas e dependência metabólica. Biofilmes são considerados importantes para a virulência da bactéria por apresentarem resistência à antibióticos, protegerem as bactérias contra radiação UV, desidratação e predadores. Além de facilitarem a troca de material genético (MADIGAN *et al.*, 2016) (SHON; BAJWA; RUSSO, 2013). Ademais, Wu *et al.* (2011) demonstraram que hvKP produzem mais biofilme do que cKP, o que pode significar que biofilmes contribuem para a maior virulência de hvKP.

Metabolismo de Alantoína

Bactérias utilizam alantoína, que é um intermediário da degradação de purina, como fonte de nitrogênio e carbono (CHOU *et al.*, 2004) (VOGELS; VAN DER DRIFT, 1976). A presença desta molécula está associada mais frequentemente com linhagens causadoras de abscessos hepáticos (COMPAIN *et al.*, 2014). Além disso, Chou *et al.* (2004) demonstraram que a deleção de um gene responsável pelo metabolismo de alantoína pode diminuir a virulência de hvKP em camundongos. O receptor de AMPc (*crp*) parece estar relacionado com a regulação positiva do metabolismo de alantoína (*allS*), além de aparentar ser importante para a virulência

da bactéria, já que mutantes que não possuem o gene *allS* foram menos virulentos para camundongos do que o selvagem (XUE *et al.*, 2016) (RUSSO; MARR, 2019).

***K. pneumoniae* e a resistência a antibióticos**

O sucesso de *K. pneumoniae* em causar infecções se deve em grande parte à linhagens multirresistentes (POMAKOVA *et al.*, 2011). Além disso, existem linhagens resistentes à antibióticos e hipervirulentas, o que dificulta imensamente o tratamento, transformando essas infecções em um grave problema para a saúde pública (FENG *et al.*, 2018) (SHON; BAJWA;RUSSO , 2018).

Acredita-se que a disseminação de genes de resistência ocorra devido ao uso inapropriado de antibióticos, principalmente em clínicas e hospitais, e também na agropecuária. Além disso, a dificuldade em encontrar novos antibióticos que sejam efetivos para o tratamento de infecções causadas por patógenos resistentes também tem contribuído para essa disseminação (CDC, 2014).

Os principais mecanismos utilizados pelas bactérias para se tornarem resistentes são: a inativação de antibióticos realizada por enzimas e a redução na absorção destes antimicrobianos em consequência da diminuição da permeabilidade da membrana (ALEKSHUN; LEVY, 2007) (RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015). Isso ocorre pois antibióticos que não são capazes de se difundir livremente pela membrana podem atravessá-la para atingir seus alvos intracelulares através de porinas, uma diminuição no número de porinas reduz a permeabilidade da membrana, dificultando a absorção de antibióticos (ALEKSHUN; LEVY, 2007) (PAGES; JAMES; WINTERHALTER, 2008). Além disso, a resistência também pode ocorrer devido à expulsão de antimicrobianos da célula bacteriana através de bombas de efluxo e devido à modificação dos alvos da droga (ALEKSHUN; LEVY, 2007) (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013) (RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015). Mutações em genes cromossomais que vão gerar um aumento da expressão de mecanismos de resistência intrínsecos, como enzimas responsáveis por inativar antibióticos e bombas de efluxo, também podem ser responsáveis pela resistência (RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015).

Genes de resistência podem estar presentes no cromossomo bacteriano, mas também em plasmídeos conjugativos e elementos conjugativos integrativos (*ICE - Integrative and conjugative elements*) (FENG *et al.*, 2018) (RUSSO; MARR, 2019). ICEs normalmente possuem genes para integração e excisão, além de serem encontrados integrados no cromossomo do hospedeiro. Enquanto que plasmídeos conjugativos são elementos extracromossomais que possuem replicação autônoma (JOHNSON; GROSSMAN, 2015). Então, genes de resistência podem ser adquiridos por meio da transferência horizontal desses elementos genéticos móveis (plasmídeos e ICEs) (RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015).

cKP é conhecida por apresentar elevada resistência à antibióticos. Até então não existem relatos de plasmídeos de resistência que tenham surgido em linhagens de hvKP (XIE *et al.*, 2018). Com isso, hvKP pode adquirir resistência através da aquisição de um plasmídeo de virulência presente em cKP que é resistente à antibióticos (DONG *et al.*, 2018) (RUSSO; MARR, 2019).

K. pneumoniae é intrinsecamente resistente à alguns antibióticos β -lactâmicos, como ampicilina e penicilina, devido à presença de genes que codificam para β -lactamases (genes *bla*) presentes no genoma *core* dessas bactérias (MARTIN; BACHMAN, 2018) (RUSSO; MARR, 2019). Essas enzimas são as responsáveis por clivar o anel β -lactâmico presente nesses antibióticos (ABRAHAM; CHAIN, 1940). Em 1965, foi relatado o primeiro caso de uma bactéria Gram-negativa (*E. coli*) produzindo uma β -lactamase, esta foi denominada TEM-1 (DATTA; KONTOMICHALOU, 1965). Anos mais tarde, outra β -lactamase foi isolada de *K. pneumoniae* e chamada de SHV-1 (variante sulfidril). A classificação molecular de Ambler dividiu as β -lactamases em quatro classes: A, B, C e D. A classe A corresponde a penicilinases, como as enzimas TEMs, SHVs e CTX-Ms e KPCs; a classe B está relacionada com as metalo β -lactamases como VIMs e imipenases; já a classe C é composta por cefalosporinases AmpCs e a classe D por oxacilinases (OXAs) (AMBLER, 1980) (BUSH, 2013). As classes A, C e D são formadas por enzimas que possuem uma serina em seu sítio ativo, já a classe B possui pelo menos um íon zinco no sítio ativo da enzima para auxiliar na hidrólise (BUSH; JACOBY, 2010).

β -lactamases também podem ser classificadas de acordo com sua função, sendo o grupo 1 composto por cefalosporinases que não são muito inibidas por ácido clavulânico, o grupo 2 composto por penicilinas, cefalosporinas e ESBL (enzimas TEM e SHV foram classificadas no grupo 2b, enquanto que derivações dessas enzimas que possuem fenótipo ESBL foram classificadas no grupo 2be. Já enzimas OXA foram classificadas no grupo 2d). Por fim, o grupo 3 é composto por metalo β -lactamases que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). Carbapenemases podem ser encontradas nas classes A, B e D (QUEENAN; BUSH, 2007). Já os antibióticos β -lactâmicos são divididos em penicilínicos (penicilina e ampicilina), cefalosporinas, carbapenêmicos (Imipenem, Meropenem, Estapenem e Panipenem) e clavulanato (mais utilizado para inativar a β -lactamase, pois possui um espectro de ação muito pequeno) (PANDEY; CASCELLA, 2019).

β -lactamases de espectro estendido (ESBL - *Extended-spectrum β -lactamases*) são enzimas responsáveis por hidrolisar oximino-cefalosporinas, como aztreonam, cefalosporinas de terceira, e em alguns casos, de quarta geração. Estas são codificadas por genes presentes no genoma acessório de *K. pneumoniae* (MARTIN; BACHMAN, 2018). Em muitos casos, outros genes de resistência à antibióticos e à metais pesados podem estar presentes no mesmo plasmídeo que possui o gene para ESBL (JACOBY; SUTTON, 1991).

Geralmente, ESBL fazem parte da classe A de β -lactamases, sendo composta por enzimas TEM, SHV e CTX-M que sofreram algum tipo de modificação que as concedeu o fenótipo ESBL (BAJPAI *et al.*, 2017). Enzimas OXA, pertencentes à classe D, também podem compor as ESBLs. Estas possuem ação contra oxacilina e cloxacilina, apresentando uma alta atividade de hidrólise. Além disso, não são muito inibidas por ácido clavulânico (BRADFORD, 2001). Carbapenêmicos têm sido utilizados para tratar infecções causadas por bactérias que possuem EBSL (MARTIN; BACHMAN, 2018). Ademais, ESBL são inibidas por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (BUSH *et al.*, 1995). Altos níveis de expressão de AmpC β -lactamases também conferem resistência aos mesmos antibióticos que são substratos para ESBL, além de cefamicinas (XU *et al.*, 2018).

Devido ao uso excessivo de carbapenêmicos para tratar infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL, *K. pneumoniae* resistente à carbapenêmicos se tornou um grande problema para saúde pública (MARTIN; BACHMAN, 2018). Nestes antibióticos, um átomo de carbono substituiu um átomo de enxofre presente no anel da molécula de penicilina. A resistência à carbapenemases pode ocorrer devido à uma superexpressão de bombas de efluxo que são importantes para expulsar antibióticos de bactérias (FILGONA; BANERJEE, ANUPURBA, 2015), à mutações em porinas que formam poros na membrana auxiliando a penetração de antibióticos em patógenos (KACZMAREK et al., 2006) ou à superexpressão de enzimas como ESBL e AmpC (BUSH; JACOBY, 2010). Além disso, pode ocorrer disseminação de carbapenemases codificadas em plasmídeos, e aparentemente, estes se tornaram comuns no genoma acessório de *K. pneumoniae* (MARTIN; BACHMAN, 2018).

A carbapenemase mais frequentemente encontrada em *K. pneumoniae* é a de classe A (KPC). Mas outros tipos foram descritos, como Nova Delhi Metalo β -lactamase-1 (NDM-1) que pertence à classe B de metalo β -lactamases (MBL) (YONG et al., 2009). Infecções com bactérias que possuem esta enzima estão associadas com pessoas indianas ou descendentes, assim como aquelas que estiveram presentes em áreas endêmicas na Índia (KAMURASAMY et al., 2010) (van der BIJ; PITOUT, 2012). Carbapenemases conferem resistência aos mesmos substratos de ESBLs, cefamicinas e carbapenêmicos (RUSSO; MARR, 2019).

Colistina é um antibiótico da classe Polimixina que é utilizado como último recurso para tratar infecções causadas por linhagens bacterianas produtoras de metalo β -lactamases (NDM-1), mas pode causar problemas neurológicos e renais (JERKE et al., 2016) (MARTIN; BACHMAN, 2018). O mecanismo de ação deste antibiótico é baseado na interação com o lipídeo A. A resistência normalmente ocorre devido à mutações no genoma *core* da bactéria, como no gene *mgrB* que regula modificações no lipídeo A do patógeno (MARTIN; BACHMAN, 2018). Mas a presença de genes de resistência para colistina, como *mcr-1*, em plasmídeos já foi descrita e gera grande preocupação para a saúde pública (LIU et al., 2016). A expressão aumentada da via PhoP-PhoQ-Arn é um dos mecanismos que medeia a resistência. A ativação desta via gera uma superexpressão do operon *arn*, com isso, grupos catiônicos são adicionados

ao fosfato do lipídeo A. Com a diminuição da carga negativa, a atividade das polimixinas é reduzida (CANNATELLI *et al.*, 2014) (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013).

Tetraciclinas são antibióticos capazes de se ligar de forma reversível à subunidade 30S do ribossomo, inibindo a síntese proteica. Assim, são considerados bacteriostáticos. Sistemas de efluxo são a principal causa para resistência contra estes antimicrobianos, mas alguns estudos também demonstraram que esta pode ocorrer devido à modificações no ribossomo e modificações na estrutura do antibiótico (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013). Tigeciclina é um antibiótico derivado de tetraciclina, para o qual já existem relatos de linhagens de *K. pneumoniae* resistentes. Aparentemente, a superexpressão do gene *acrR* que codifica para uma bomba de efluxo e o seu regulador *ramA* estão associados com esta resistência (HUANG *et al.*, 2018) (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013).

Aminoglicosídeo é um grupo de antibióticos que inclui canamicina, gentamicina, estreptomicina, tobracina, amicacina, arbecacina e apracina. Estes são muito utilizados para tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas. O mecanismo de ação consiste na ligação do antimicrobiano à subunidade 30s do ribossomo e com isso, ocorre a inibição da síntese proteica no patógeno. Além disso, estes antibióticos são capazes de interferir na tradução do mRNA em proteínas. No caso de *K. pneumoniae*, o mecanismo mais utilizado para conferir resistência à este antimicrobiano é a presença de enzimas denominadas aminoglicosídeo acetiltransferases (*aac*). Essas enzimas catalisam a transferência de grupos acetil da acetil-CoA para um grupo amino de aminoglicosídeos, tornando-os ineficazes (NASIRI *et al.*, 2018). Mas a resistência também pode ocorrer devido à modificações na membrana externa da bactéria que diminuem a permeabilidade, bombas de efluxo e modificações no ribossomo como a metilação do sítio de ligação do antibiótico por 16s rRNA metilases (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013).

Fluoroquinolonas são antibióticos que possuem como alvo a DNA girase em bactérias Gram-negativas. Então a resistência pode ocorrer devido à modificações neste alvo, à presença de bombas de efluxo, à diminuição na expressão de porinas ou

à disseminação de genes de resistência como *qnr* (WANG *et al.*, 2004) (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013). Alguns dos membros deste grupo de antibióticos são ciprofloxacina, ofloxacina e norfloxacina (KING *et al.*, 2000)

Por fim, a resistência a macrolídeos está associada principalmente com bombas de efluxo, no caso de bactérias Gram-negativas. Estes antibióticos se ligam ao ribossomo de forma reversível e inibem a síntese proteica. O principal representante desta classe de antibióticos é a eritromicina (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013).

Diagnóstico de infecções causadas por *K. pneumoniae*

Atualmente, o maior problema para realização do diagnóstico é a dificuldade em diferenciar cKP e hvKP. No caso de infecções com hvKP, como estas bactérias possuem a capacidade de se espalhar metastaticamente, exames para identificação de infecções em diferentes locais são importantes (PATEL; RUSSO; KARCHMER, 2014).

O critério clínico que define infecções por hvKP como aquelas que são invasivas, adquiridas na comunidade e afeta pessoas saudáveis não é tão eficiente. Já que casos de infecção por hvKP em pacientes com doenças subjacentes ou imunocomprometidos, assim como infecções adquiridas em hospitais têm se tornado bem comuns (RUSSO; MARR, 2019).

Concentrações maiores que 30 ug/mL de alguns fatores de virulência como *peg-344*, *iroB*, *iucA*, *rmpA*, *rmpA2* têm se mostrado uma forma eficiente de diferenciar cKP e hvKP (RUSSO *et al.*, 2017). Então avaliar a produção total de sideróforos, *iuc* e *rmpA* ou *rmpA2* seria a melhor maneira para realizar esta distinção, como demonstrado em um estudo em que uma linhagem cKP se tornou hipervirulenta quando adquiriu um plasmídeo com a deleção de *iro*, *peg-344* e *rmpA*, mas que possuía *rmpA2* e *iuc* (GU *et al.*, 2018) (RUSSO; MARR, 2019). Uma forma fácil de identificar estes biomarcadores seria através da realização de PCR (YU *et al.*, 2018). Espectrometria de massa também pode ser utilizada, mas requer mais estudos para refinar a técnica (RODRIGUES *et al.*, 2016).

Tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae*

A principal forma de tratamento é através do uso de antimicrobianos. Carbapenêmicos são utilizados no tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* que possuem enzimas com fenótipo ESBL (MARTIN; BACHMAN, 2018). Enquanto que infecções com KPCs podem ser tratadas com tigercilina ou colistina. O local da infecção pode dificultar a ação do antibiótico devido à dificuldade em alcançar o seu alvo. Além disso, meningite, infecções no cérebro e endoftalmia requerem tratamentos específicos com antibióticos, para que estes atinjam o local e a concentração adequados (LIU *et al.*, 1986). O excesso de muco gerado pelo fenótipo de hiper mucoviscosidade, frequentemente presente em hvKP, pode entupir cateteres utilizados para drenagem percutânea, dificultando o tratamento de abscessos (RUSSO; MARR, 2019).

Linhagens multirresistentes representam um grande desafio para os profissionais de saúde (RUSSO; MARR, 2019). Devido à isso, estudos estão sendo realizados para a utilização de imunização passiva, OMPs são um possível alvo desta terapia, mas a presença de polissacarídeos capsulares pode atrapalhar o acesso à estas proteínas como foi demonstrado em um estudo com *Acinetobacter baumannii* e *E. coli* (WANG-LIN *et al.*, 2017) (RUSSO *et al.*, 2008). Então, o alvo ideal seria polissacarídeos presentes na superfície da bactéria. Uma pesquisa demonstrou que anticorpos IgG específicos para polissacarídeos capsulares de *K. pneumoniae* K1 foram eficazes para proteger de sepse e infecção pulmonar em camundongos, além de diminuir a disseminação de hvKP do trato gastrointestinal para outros órgãos destes animais. Estes anticorpos agem promovendo a fagocitose mediada pelo receptor Fc e também aumentando a liberação de armadilhas mediadas por neutrófilos (NETs) (DIAGO-NAVARRO *et al.*, 2016) (RUSSO; MARR, 2019). Neste caso, o desafio é conseguir superar a grande variedade de polissacarídeos presentes na cápsula de *K. pneumoniae*.

Outro possível tratamento é baseado no uso de bacteriófagos. Um estudo demonstrou que estes vírus foram eficazes em reconhecer especificamente *K. pneumoniae* com sorotipo capsular K1 e gerar a lise da cápsula bacteriana utilizando

uma depolimerase, promovendo assim uma maior sobrevivência em camundongos (LIN *et al.*, 2014) (RUSSO; MARR, 2019).

Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ)

Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma são fatores de transcrição importantes para a regulação de genes relacionados à adipogênese, homeostase de lipídeos e de glicose, inflamação e manutenção da homeostase metabólica. Estes possuem três isoformas PPAR- α , PPAR- β/δ e PPAR- γ que se diferenciam de acordo com sua distribuição nos tecidos, especificidade de ligantes e papéis fisiológicos (JANANI; KUMARI, 2014). No núcleo, quando o ligante se associa à PPAR, moléculas corressoras são liberadas e ocorre a formação de um heterodímero com o receptor retinóide X (RXR), o qual também está associado à seu ligante. Este heterodímero se liga à elementos responsivos de PPAR (PPREs) na região promotora dos genes alvo para regular a transcrição destes (Figura 8) (WANG *et al.*, 2014).

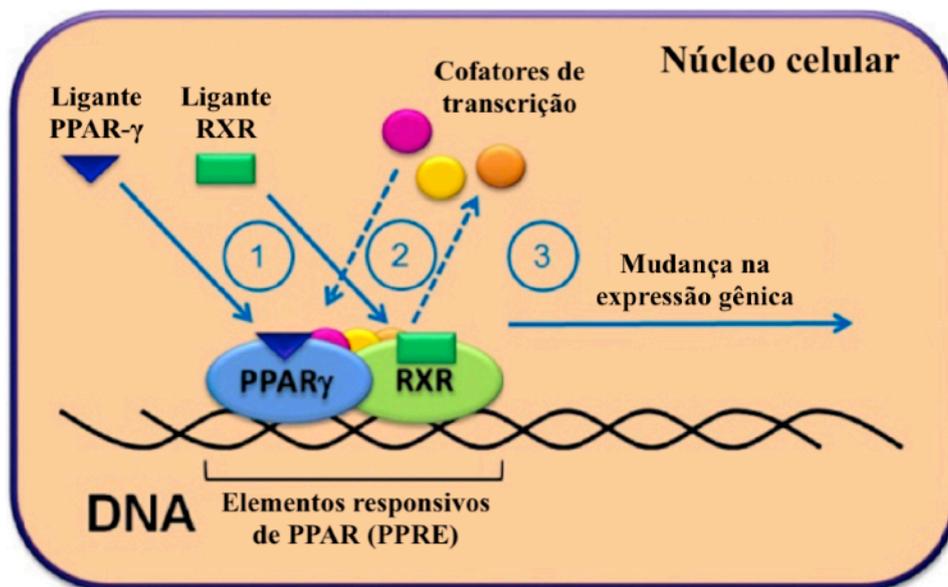


Figura 8. Ação de PPAR- γ na regulação da expressão de genes alvo. Imagem adaptada de Wang *et al.*, 2014.

O gene do PPAR- γ produz três mRNAs (PPAR- γ 1, PPAR- γ 2, PPAR- γ 3), sendo que PPAR- γ 1 e PPAR- γ 3 são idênticos e expressos em praticamente todas as células. Enquanto que PPAR- γ 2 possui uma região N-terminal adicional com 30 aminoácidos e é expresso apenas no tecido adiposo, além de ser um fator de transcrição mais potente que é regulado de acordo com a ingestão de nutrientes (JANANI; KUMARI, 2014).

PPAR- γ é expresso nos tecidos adiposos marrom e branco, no intestino, em células hematopoiéticas, no fígado, nos rins, nos músculos e no pâncreas. Este é importante para regular a adipogênese, para o metabolismo de lipídeos e lipoproteínas, para a homeostase de glicose, para regular a sensibilidade à insulina, para modular o metabolismo e inflamação em células do sistema imune, além de controlar a proliferação celular (WANG *et al.*, 2014).

Alguns ligantes naturais capazes de ativar PPAR- γ são ácidos graxos e eicosanoides, enquanto que ligantes sintéticos são os representantes da classe de fármacos Tiazolidinediona, que são utilizados para o tratamento de diabetes mellitus do tipo 2 (BERGER; MOLLER, 2012).

PPAR- γ também é expresso em células do sistema imune como macrófagos, neutrófilos, linfócitos, dentre outras. Agonistas de PPAR- γ inibem a produção de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-6, IL-12, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. Além disso, a ativação de PPAR- γ aumenta a fagocitose mediada pelo receptor Fc γ de alvos opsonizados com anticorpos IgG. Isso significa que a ativação de PPAR- γ é importante durante infecções bacterianas, já que estudos mostraram que ocorre um aumento da fagocitose de bactérias por macrófagos alveolares que foram tratados com agonistas de PPAR- γ como troglitazona e rosiglitazona (Tiazolidinedionas) (ARONOFF *et al.*, 2007). Asada *et al.* (2004) demonstraram que a ativação de PPAR- γ em macrófagos alveolares está relacionada com um aumento da expressão de CD36, com inibição da produção de citocinas e com fagocitose de neutrófilos apoptóticos, o que é importante para controlar a inflamação. Ademais, a ativação de PPAR- γ também pode modular a ação de NF- κ B, que é um fator de

transcrição responsável por controlar a expressão de genes relacionados à resposta inflamatória (LIBBY; PLUTSKY, 2007).

Outro papel de relevância de PPAR- γ é na modulação da inflamação em modelos de septicemia. Células endoteliais *knockouts* de PPAR tiveram uma resposta inflamatória induzida por LPS bem exacerbada nos pulmões de camundongos, com produção de edema, espécies reativas de oxigênio e citocinas pro-inflamatórias. Além de uma maior expressão de TLR4, que aumentou a ativação da cascata inflamatória *downstream* (REDDY *et al.*, 2012).

Por outro lado, alguns estudos demonstram que PPAR- γ aparenta ter um papel negativo para o hospedeiro durante infecções bacterianas, pois para que granulócitos possam combater infecções bacterianas, esses precisam ser capazes de migrar até o local de infecção, o que ocorre como resposta à moléculas específicas como IL-8. A ativação de PPAR- γ inibe esta migração, dificultando o combate à uma infecção bacteriana (REDDY *et al.*, 2008). Além disso, ligantes de PPAR- γ podem gerar apoptose de macrófagos (BODLES *et al.*, 2006).

Mycobacterium tuberculosis é uma bactéria capaz de gerar um aumento na expressão de PPAR- γ , o que aumenta a biogênese de corpúsculos lipídicos e modula negativamente a resposta de macrófagos. Facilitando assim a sobrevivência e multiplicação bacteriana no interior do hospedeiro (MAHAJAN *et al.*, 2012) (ALMEIDA *et al.*, 2012).

O que demonstra que PPAR- γ possui papéis diferentes durante uma infecção, já que contribui para reduzir a resposta inflamatória e para o *clearance* bacteriano, mas também reduz a migração de granulócitos e gera apoptose de macrófagos (ARONOFF *et al.*, 2007) (ASADA *et al.*, 2004) (REDDY *et al.*, 2008) (BODLES *et al.*, 2006).

Um melhor entendimento do papel do PPAR- γ em infecções bacterianas pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias, já que agonistas desses receptores têm se mostrado importantes para modular a inflamação e para controlar a infecção devido à sua ação antibacteriana. Mas mais estudos são necessários para que

essas terapias sejam aplicadas adequadamente, devido ao duplo papel de PPAR- γ durante essas infecções (REDDY; LACKCHIMI; REDDY, 2016).

II. Justificativa

Linhagens hv/hm de *K. pneumoniae* típicas são conhecidas por apresentarem elevada patogenicidade, pertencerem aos sorotipos K1 ou K2 e apresentarem fenótipo de hipermucoviscosidade mediado pelos reguladores transcricionais *rmpA* e *rmpA2*. Estas linhagens apresentam grande capacidade invasiva e provocam infecções sistêmicas, muitas vezes associadas ao fenótipo de hipermucoviscosidade. Linhagens hv/hm de *K. pneumoniae* atípicas, por outro lado, possuem alto potencial patogênico mas não apresentam os marcadores moleculares de virulência daquelas hv/hmKP típicas, como sorotipo K1 ou K2 e o fenótipo de hipermucoviscosidade não é gerado pelos reguladores transcricionais *rmpA* e *rmpA2*. Na atualidade, pouco se conhece sobre os mecanismos de patogenicidade que estão associados à capacidade de disseminação destas linhagens no interior do hospedeiro.

hv/hmKP possuem a capacidade de causar infecções tanto em pacientes imunocomprometidos, quanto em pacientes saudáveis. Esta alta patogenicidade associada à multirresistência e à forte produção de biofilme representam grande preocupação para a saúde pública, principalmente em ambiente hospitalar.

Uma linhagem hipermucoviscosa de *K. pneumoniae* (Kp 34) foi isolada de uma cultura de *swab* nasal de um paciente com bacteremia do Hospital Universitário de Brasília (HUB). A linhagem apresentou habilidade de invasão e sobrevivência no interior de células epiteliais, citotoxicidade, sobrevivência em soro e sangue humanos e alta capacidade de produzir biofilme. Apesar de possuir alto potencial virulento, a linhagem não apresentou nenhum dos marcadores de hipervirulência conhecidos, além do fenótipo hipermucoviscoso (De Campos *et al.*, 2018). Então, este trabalho busca avaliar o papel do fenótipo de hipermucoviscosidade na patogenicidade de uma linhagem de hmKP e identificar possíveis genes associados à este fenótipo. Estes conhecimentos são importantes para auxiliar na compreensão dos mecanismos de patogenicidade desta linhagem e poderão ser futuramente utilizados para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por linhagens de *K. pneumoniae* de alta capacidade invasiva.

III. Objetivos

Objetivo geral

Avaliar o papel da hiper mucoviscosidade na patogenicidade de mutantes obtidos a partir de uma linhagem de *K. pneumoniae*.

Objetivos específicos

- Obter linhagens de *K. pneumoniae* com hiper mucoviscosidade negativa a partir da mutagênese da linhagem hm atípica *Kp 34* (portadora do fenótipo de hiper mucoviscosidade) utilizando o transposon TnPhoA;
- Avaliar a taxa de multiplicação da linhagem selvagem (*Kp 34*) com relação às mutantes e verificar a presença da cápsula nos mutantes;
- Quantificar a produção de biofilme da bactéria selvagem (*Kp 34*) e das mutantes em superfície de poliestireno;
- Testar a capacidade de *Kp 34* e dos mutantes de sobreviver em sangue e soro humanos;
- Determinar a capacidade dessas linhagens bacterianas em invadir e sobreviver no interior de células epiteliais (HEp-2);
- Quantificar a produção de NO em células epiteliais (HEp-2) infectadas por *Kp 34* e pelos mutantes.
- Testar a viabilidade de células epiteliais (HEp-2) após infecção por *Kp 34* e pelos mutantes;
- Avaliar a expressão de PPAR- γ em células epiteliais HEp-2 infectadas por *Kp 34* e pelas linhagens mutantes;
- Identificar os sítios de inserção do transposon TnPhoA nas linhagens mutantes;
- Sequenciar os fragmentos obtidos como produtos das PCRs para obter um *screening* inicial dos possíveis genes relacionados ao fenótipo de hiper mucoviscosidade.

IV. Materiais e Métodos

Delineamento experimental

Obtenção de linhagens
mutantes com
hipermucoviscosidade
negativa



Conjugação entre *E. coli* SM10, contendo o plasmídeo pRT733 que possui o transposon TnPhoA, e *K. pneumoniae* hipermucoviscosa.

Caracterização
biológica dos mutantes



- Hipermucoviscosidade (*String Test*);
- Curva de Crescimento;
- Coloração de cápsula com tinta nanquim;
- Produção de biofilme;
- Sobrevivência bacteriana em sangue e soro humanos;
- Sobrevivência bacteriana no interior de células epiteliais (HEp-2);
- Produção de NO por células epiteliais (HEp-2) infectadas;
- Viabilidade celular após infecção.

Avaliação da expressão
de PPAR- γ por células
epiteliais HEp-2



- Citometria de fluxo.

Screening inicial de genes
associados ao fenótipo
de hipermucoviscosidade



- AP-PCRs;
- Sequenciamento dos produtos das PCRs para determinação dos possíveis genes relacionados ao fenótipo de hipermucoviscosidade.

1. Isolamento, cultivo e armazenamento das linhagens bacterianas

O isolado bacteriano de *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta (*Kp* 34) foi obtido a partir de cultura de swab nasal de um paciente do Hospital Universitário de Brasília (HUB). Após isolamento, esta cepa foi cultivada por 18h em meio LB (Sigma) líquido a 37 °C, e em seguida, armazenada em freezer -80 °C em meio LB com glicerol (50%).

O isolado bacteriano de *Escherichia coli* SM10 contendo o plasmídeo pRT733 com o transposon TnphoA utilizado para a mutagênese, foi cedido pelo Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Este isolado foi então cultivado por 18h em meio LB líquido a 37 °C, e em seguida, armazenado em freezer -80 °C em meio LB com glicerol (50%).

A obtenção das linhagens foi realizada conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (parecer número 1.131.054 – CAEE 44867915.1.0000.5558).

2. Obtenção de mutantes

A mutagênese foi realizada por meio da utilização de um plasmídeo (pRT733) que contém o transposon TnphoA, este pode se inserir aleatoriamente em genes cromossomais e plasmidiais através de um processo de conjugação (TAYLOR *et al.*, 1989) (DAS; NESTER, 2014).

A conjugação foi realizada entre a bactéria hipervirulenta *Kp* 34 (linhagem receptora) e a bactéria *Escherichia coli* SM10 (linhagem doadora). Ambas foram cultivadas em caldo LB (Sigma) à 37 °C até que a linhagem doadora atingisse a fase exponencial e a linhagem receptora atingisse a fase estacionária de crescimento. Posteriormente, 1 mL de cada cultura foi centrifugado a 12000 g por 30s, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com solução salina 0,85%. Os tubos contendo o precipitado foram centrifugados novamente a 12000 g por 30s e o sobrenadante foi descartado. O precipitado da bactéria doadora (*E. coli*) foi ressuspensionado em 75 uL de meio LB líquido, e todo este conteúdo foi passado para o tubo contendo a linhagem receptora (*Kp* 34). Para permitir que o processo de

conjugação ocorresse de forma eficiente, uma membrana *millipore* de 0,22 um foi colocada em uma placa com meio LB Ágar. 100 uL do material contendo as linhagens doadora e receptora foram colocados sobre a membrana. A placa foi mantida por 2h à temperatura ambiente, e em seguida invertida e incubada por 18h à 37 °C. A membrana foi então passada para um tubo contendo 1 mL de meio LB líquido, e o tubo foi agitado (vortex) por 1min. Posteriormente, a membrana foi descartada e 1mL da solução bacteriana foi centrifugada a 12000 g por 30s. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com solução salina 0,85%. Em seguida, o precipitado foi ressuspendido em 100 uL de solução salina 0,85% e 100 uL das diluições 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³, além do material sem diluição foram plaqueados em meio LB ágar contendo os antibióticos canamicina (30 ug/mL) e cloranfenicol (25 ug/mL). O plasmídeo pRT733, além de conter o transposon TnPhoA, também contém gene de resistência à canamicina, então este antibiótico foi utilizado para selecionar as bactérias que obtiveram este plasmídeo. Para evitar que cepas de *E. coli* que não doaram o plasmídeo também crescessem no meio, o antibiótico cloranfenicol foi utilizado para selecionar apenas cepas de *Klebsiella pneumoniae* que obtiveram o plasmídeo pRT733, e conseqüentemente o transposon TnphoA. As placas foram incubadas por 24h à 37 °C. As colônias que cresceram foram então passadas para tubos contendo LB líquido com canamicina (30 ug/mL). As bactérias foram posteriormente armazenadas em freezer a -80 °C em caldo LB com glicerol (50%) (AZEVEDO; Da COSTA, 1973).

3. Teste de Hipermucoviscosidade

A bactéria selvagem *Kp* 34 e os mutantes obtidos foram inoculados em tubos contendo caldo LB (Sigma) e incubados por 18h à 37 °C. Em seguida, as linhagens foram inoculadas em placas contendo LB Ágar com 5% de sangue humano por 18h à 37 °C. O teste realizado é chamado de *String Test* e consiste em utilizar uma alça de inoculação para tocar na colônia, caso haja a formação de uma corda viscosa com mais de 5 mm de comprimento, este é considerado positivo e as linhagens são consideradas hipermucoviscosas (SHON; BAJWA; RUSSO, 2013).

4. Curva de Crescimento

As linhagens bacterianas (*Kp* 34 e mutantes) foram previamente cultivadas em meio LB líquido (Sigma) por 18h à 37 °C. Posteriormente, 230 uL de meio LB líquido estéril e 20uL de cada linhagem foram adicionados à uma placa de poliestireno com 96 poços, caldo LB estéril foi utilizado como controle negativo. A placa foi incubada por 450min à 37 °C, sendo que a cada 30min a densidade óptica foi medida utilizando um espectrofotômetro de microplacas *Spectramax M3* no comprimento de onda de 600 nm.

5. Coloração da cápsula com tinta nanquim

As linhagens bacterianas (*Kp* 34 e mutantes) foram previamente cultivadas em meio LB líquido (Sigma) por 18h à 37 °C. Posteriormente, 5 uL de cada isolado foi pipetado em uma lâmina junto à 5 uL de tinta nanquim. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico (Aumento: 40x) para verificar a presença da cápsula que aparece como um halo transparente sobre o fundo mais escuro.

6. Quantificação da produção de biofilme em superfície de poliestireno

As linhagens bacterianas com resultado negativo para o teste de hipermucoviscosidade (8 mutantes) e a linhagem selvagem (*Kp* 34) foram submetidas ao teste para quantificação da produção de biofilme. O ensaio foi realizado em triplicata e em três dias diferentes. As linhagens foram previamente cultivadas em meio LB líquido por 18h à 37 °C. Posteriormente, 230 uL de meio LB líquido estéril e 20 uL de cada linhagem foram adicionados à uma placa de poliestireno com 96 poços, caldo LB (Sigma) estéril foi utilizado como controle negativo. A placa foi incubada por 24h à 37 °C. Após este período de incubação, o sobrenadante de cada poço foi descartado e os poços foram lavados com solução salina (0,85%). O biofilme foi fixado com adição de metanol por 15 min. O sobrenadante foi novamente descartado e a placa foi deixada à temperatura ambiente até secar. Em seguida, o biofilme foi corado com cristal violeta por 5 min. Após esse tempo, o excesso de corante foi lavado com água corrente e a placa foi novamente deixada em

temperatura ambiente até secar. Ácido acético glacial (33%) foi adicionado para ressolubilização por 5 minutos. Para quantificação da formação de biofilme, a densidade óptica foi medida utilizando um espectrofotômetro de microplacas *Spectramax M3* no comprimento de onda de 570 nm (STEPANOVIC *et al.*, 2004).

Foi realizada a média aritmética da triplicata dos valores de absorbância de cada amostra em cada um dos três dias, esta foi comparada com a média aritmética do controle negativo de cada dia. Se o resultado da média aritmética de uma determinada amostra for menor ou igual ao valor do controle negativo, a linhagem é considerada como não produtora de biofilme. Caso o valor da média seja maior que a média do controle negativo, mas também seja menor ou igual a duas vezes o valor do controle negativo, a linhagem é produtora fraca de biofilme. Se o valor da média for maior que duas vezes o valor da média do controle negativo, mas for menor ou igual a quatro vezes o valor da média do controle negativo, a linhagem é uma produtora moderada de biofilme. E finalmente, se o valor da média for quatro vezes maior que o valor do controle negativo, a linhagem é considerada como uma produtora forte de biofilme (STEPANOVIC *et al.*, 2004).

7. Sobrevivência bacteriana em sangue e soro humanos

A capacidade das linhagens mutantes e da linhagem selvagem de *Klebsiella pneumoniae* de sobreviver em sangue e soro humanos foram determinadas de acordo com (DELEO *et al.*, 2017). Os isolados foram previamente cultivadas em caldo LB (Sigma) por 18h a 37 °C. Estes foram então inoculados em 550 uL de sangue total e em 550 uL de soro humano obtidos de doadores saudáveis. Nos tempos de 0, 30, 60 e 120min após o inóculo bacteriano no sangue, uma alíquota de 10 uL foi retirada e diluída 4x (nos tempos de 0 e 30min) ou 5x (nos tempos de 60 e 120min) em 90 uL de PBS. No caso da sobrevivência em soro, nos tempos de 0, 30, 60 e 120min após o inóculo bacteriano no soro, uma alíquota de 10 uL foi retirada e diluída 5x (nos tempos de 0 e 30min) ou 6x (nos tempos de 60 e 120min) em 90 uL de PBS. A seguir 10 uL das duas últimas diluições foram plaqueadas em placas de petri contendo meio ágar MacConkey (Acumedia), estas foram incubadas em estufa a 37 °C. Após 24h de

incubação foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Nos experimentos de sobrevivência em sangue e soro foram utilizadas 10^7 bactérias (OD a 600 nm de 0,1) de todas as linhagens bacterianas.

8. Linhagem de células epiteliais HEp-2

A linhagem HEp-2 foi utilizada para o ensaio de sobrevivência das bactérias em células epiteliais e para o teste de viabilidade dessas células após infecção com as linhagens bacterianas em questão. Estas células são derivadas de carcinoma de laringe humano, e foram obtidas do Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz. As células foram armazenadas em freezer à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ com meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) e 10% de DMSO.

9. Cultivo de células epiteliais HEp-2

As células HEp-2 foram descongeladas e cultivadas em garrafas para cultura de células com meio DMEM (Sigma Aldrich) suplementada com 10% de soro fetal bovino (Sigma Aldrich). Estas foram mantidas em estufa à 37°C com atmosfera contendo 5% de CO_2 até que o número desejado de células fosse obtido para realização de cada ensaio.

10. Sobrevivência bacteriana no interior de células epiteliais HEp-2

As células foram cultivadas em placa de 24 poços (3×10^5 células por poço), esta foi incubada por 18h em estufa à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com atmosfera contendo 5% de CO_2 . Após transcorrido este tempo, os poços foram lavados duas vezes com tampão PBS (Fosfato-salino) e as células foram infectadas com 100 uL de cada linhagem bacteriana de *K. pneumoniae* (linhagem selvagem e os 8 mutantes) com uma OD de 0,3 e utilizando um MOI de 1:1000. A placa foi centrifugada à 900 g por 2min e foi novamente incubada em estufa à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com atmosfera contendo 5% de CO_2 . Após 2h, os poços foram lavados três vezes com PBS e meio DMEM com antibiótico Gentamicina (50 ug/mL) (Sigma Aldrich) foi adicionado. A placa foi incubada em estufa à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com atmosfera contendo 5% de CO_2 . Depois de 24h, as células foram

lavadas três vezes com PBS, desadgeridas e lisadas com PBS gelado (4 °C) 0,5% de Triton 100X (Sigma Aldrich). Em seguida, o conteúdo de cada poço foi centrifugado à 12000 g por 5min, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 200 uL de PBS. O ensaio foi realizado em triplicata, então 100 uL de cada replicata foram plaqueados em placas contendo meio Ágar MacConkey (Acumedia), as placas foram incubadas à 37 °C por 18h. Outros 10 uL de cada replicata foram diluídos em 90 uL de PBS e o conteúdo foi plaqueado em placas contendo meio Ágar MacConkey que também foram incubadas à 37 °C por 18h. Após esse período, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas para determinar a sobrevivência bacteriana. As triplicatas das amostras não diluídas foram as escolhidas para análise e o valor mais discrepante foi retirado (FAVRE-BONTE; JOLY; FORESTIER *et al.*, 1999).

11. Quantificação da produção de NO por células epiteliais HEp-2 infectadas

A atividade microbicida de células epiteliais infectadas foi quantificada através do Método de Griess (SHINN, 1941) (BURGNER; ROCKETT; KWIATKOWSKI, 1999). A formação de óxido nítrico é detectada indiretamente através da quantificação de nitrito, que é um produto estável obtido a partir da oxidação do óxido nítrico. O sobrenadante obtido da cultura de células HEp-2 infectadas no tempo de 24h foi utilizado para a dosagem de nitrito. 50 uL de sobrenadante e 50 uL de reagente de Griess (Sulfanilamida 1% diluído em 5% de H₃PO₄ e NEED (naphthylethylenediamine dihydrochloride) 0,1% diluído em água destilada)) foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços. A placa foi incubada por 10min, a temperatura ambiente e protegida da luz. Após o tempo de incubação, a densidade óptica foi medida utilizando espectrofotômetro de microplacas *Spectramax* no comprimento de onda de 540 nm. Utilizou-se uma curva padrão de NaNO₂ para calcular a concentração de nitrito nas amostras. O ensaio foi feito em triplicata e o valor mais discrepante foi retirado (SUN *et al.*, 2003).

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

A viabilidade de células HEp-2 infectadas com *Klebsiella pneumoniae* foi determinada usando a substância MTT. A viabilidade celular é testada através da conversão do 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 são produzidos por células viáveis, solubilizados e submetidos à espectrofotometria. O controle de morte celular foi feito com DMSO 20% (Sigma Aldrich) e utilizamos outro controle em que as células não são estimuladas. O ensaio foi realizado em triplicata. As células foram cultivadas em placa de 96 poços (1x10⁴ células por poço) e a placa foi incubada em estufa à 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂ por 18h. No dia seguinte, as células foram infectadas com *Klebsiella pneumoniae* (OD de 0,1) e a placa foi centrifugada à 900g por 2min e foi incubada novamente em estufa à 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Após 2h de infecção, meio DMEM com o antibiótico Gentamicina (50 ug/mL de meio) foi adicionado. As placas contendo as células foram incubadas à 37 °C com 5% e CO₂ e após 3, 6 e 24h, MTT foi adicionado. A placa contendo MTT foi incubada sob proteção da luz em estufa a 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Após duas horas da adição do MTT foi realizada a ressolubilização utilizando 100 uL de DMSO 100%. A placa foi submetida à leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (*SpectraMax M3*) no comprimento de onda de 570 nm. Quanto menor a viabilidade celular, menor a redução do MTT e menor o sinal obtido pelo espectrofotômetro (MOSMANN, 1983).

13. Citometria de Fluxo PPAR- γ

Para analisar a expressão de PPAR- γ , células HEp-2 foram cultivadas em placa de 24 poços (3x10⁵ células por poço), esta foi incubada por 18h em estufa à 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Após transcorrido este tempo, os poços foram lavados duas vezes com PBS e as células foram infectadas com 100 uL de cada linhagem bacteriana de *K. pneumoniae* (linhagem selvagem e os 8 mutantes) com uma OD de 0,3 e utilizando um MOI de 1:1000. A placa foi centrifugada à 900 g por

2min e foi novamente incubada em estufa à 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Após 2h, os poços foram lavados três vezes com PBS e meio DMEM com antibiótico Gentamicina (50 ug/mL) foi adicionado. A placa foi incubada em estufa à 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂ durante 24h. Após este período, as células foram lavadas com PBS e desaderidas com tripsina 0,25% (Sigma) por 5min. Depois, estas foram fixadas com paraformaldeído 1% por 10min à temperatura ambiente, permeabilizadas com solução contendo PBS, 5% de soro fetal bovino (Sigma Aldrich) e 0,2% de Triton X-100 (Sigma) por 5min também à temperatura ambiente. Em seguida, solução de bloqueio contendo PBS e 5% de soro fetal bovino foi adicionada e as amostras foram mantidas no gelo por 30min. Após este tempo, anticorpo primário policlonal anti-PPAR γ (*Santa Cruz Biotechnology*) foi adicionado em uma concentração de 1:50 por uma hora e meia. As amostras foram lavadas com PBS + 5% de soro fetal bovino e em seguida, anticorpo secundário *anti-rabbit* FITC (*Santa Cruz Biotechnology*) foi adicionado em uma concentração de 1:100 por 45min. As amostras foram novamente lavadas com PBS + 5% de soro fetal bovino e estocadas à 4 °C. Foram utilizados três controles para o experimento: Controle que não foi marcado com nenhum anticorpo, controle marcado apenas com anticorpo primário e controle marcado apenas com anticorpo secundário. Posteriormente, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo no equipamento *FACSCalibur* (BD Bioscience) em que 10 mil eventos foram adquiridos por amostra.

14. Identificação do sítio de inserção do transposon TnPhoA

O sítio de inserção do transposon TnPhoA, utilizado para mutagênese, foi identificado por meio da utilização de AP-PCR (*arbitrary primed PCR*) com primers arbitrários e primers específicos para TnPhoA (Tabela 1) (DAS *et al.*, 2005). Inicialmente, os primers arbitrários utilizados foram REP1R e REP2, estes são usados para elementos extragênicos repetitivos palindrômicos, que são regiões muito conservadas do genoma (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991). Os primers específicos utilizados foram Tn903-3 e Tn903-4 (BODDICKER *et al.*, 2006). Foi utilizado um volume final de 25 uL para cada reação contendo 50 pmol de cada

primer (os primers arbitrários foram pareados com os primers específicos de acordo com a Tabela 2), 100 ng de *template* DNA, 1,25mM de cada um dos 4 dNTPs, 2U de Taq DNA Polimerase (Promega) em um tampão com 10% de DMSO (Sigma Aldrich). O ciclo utilizado foi desnaturação inicial das fitas [95°C, 7min], seguida por 30 ciclos de desnaturação [90°C, 30s], anelamento [40°C, 1min] e alongação [65°C, 8min], finalizando com um único ciclo de alongação final [65°C, 16min] (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991). Os produtos deste primeiro *round* foram purificados com o kit *ReliaPrep DNA Clean-Up and Concentration System* (Promega) e utilizados como *template* DNA para o segundo *round* de PCR. Os primers arbitrários utilizados foram novamente REP1R e REP2, além de ARB2. Já os primers específicos foram Tn903-3 e Tn903-4, assim como no *round* 1 (os primers arbitrários foram pareados com os primers específicos de acordo com a Tabela 3). 9 uL de cada reação do *round* 2 foram submetidos a eletroforese em gel com 1% de agarose contendo tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 1X.

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados para identificação do sítio de inserção do transposon TnPhoA.

Nome	Sequência (5' - 3')
REP1R	NNNCGNCGNCATCNGGC
REP2	NCGNCNTATCNGGCCTAC
ARB2	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Tn903-3	TGAATGTTCCGTTGCGCTGCCC
Tn903-4	GCAGTTTCATTTGATGCTCGAT

Tabela 2. Primers utilizados para identificação do sítio de inserção de TnPhoA por meio de PCR: *round 1*.

Número	Primers Arbitrários	Primers Específicos
1	REP1R	Tn903-3
2	REP1R	Tn903-4
3	REP2	Tn903-3
4	REP2	Tn903-4

Tabela 3. Primers utilizados para identificação do sítio de inserção de TnPhoA por meio de PCR: *round 2*

Número	Primers Arbitrários	Primers Específicos
1	REP1R	Tn903-3
2	REP1R	Tn903-4
3	REP2	Tn903-3
4	REP2	Tn903-4
5	ARB2	Tn903-3
6	ARB2	Tn903-4

15. Sequenciamento

Os produtos da PCR *round 2* submetidos à eletroforese foram purificados a partir dos géis utilizando o kit *ReliaPrep DNA Clean-Up and Concentration System* (Promega). Em seguida, as amostras foram preparadas para sequenciamento (Método de Sanger - Sequenciador ABI 3130xl da *AppliedBiosystems*), o volume final utilizado foi de 7 uL contendo DNA (a quantidade utilizada seguiu a Tabela 4) e 3,2 pmol de primer (Tabela 1). O sequenciamento realizado foi um serviço prestado pelo Laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília. Os resultados do sequenciamento foram analisados utilizando a plataforma BLASTx do NCBI.

Tabela 4. Quantidade de amostra de DNA para sequenciamento.

Tamanho dos fragmentos (Produtos de PCR)	Quantidade de <i>template</i> DNA para sequenciamento
100-200 pares de base	1-3 ng
200-500 pares de base	3-10 ng
500-1000 pares de base	5-20 ng

16. Análise de dados

A análise estatística foi feita utilizando o software *GraphPadPrism* 8 para realizar *One-way ANOVA* e *Turkey's multiple comparisons test*.

V. Resultados

1. Mutagênese e teste de hipermucoviscosidade

Para obter mutantes que não apresentam o fenótipo de hipermucoviscosidade, um processo de conjugação entre *K. pneumoniae* (*Kp* 34) e *E. coli* SM10 foi realizado. 100 mutantes que tiveram o plasmídeo pRT733 contendo o transposon TnPhoA inserido em seu genoma foram selecionados com os antibióticos canamicina e cloranfenicol. Estes foram testados com relação à presença do fenótipo de hipermucoviscosidade através do *string test*. Com isso, 8 mutantes testaram negativo e foram denominados: M14, M45, M48, M67, M68, M84, M87 e M93. A linhagem selvagem (*Kp* 34) é positiva para a hipermucoviscosidade como demonstrado por De Campos *et al.* (2018) e a presença deste fenótipo foi confirmada por *string test* realizado junto aos mutantes.

2. Curvas de crescimento

Para avaliar a taxa de multiplicação da linhagem selvagem (*Kp* 34) e dos mutantes, curvas de crescimento foram realizadas através da quantificação da absorbância (600 nm) durante 450 min. Os resultados demonstram que com exceção de M67, todos os outros mutantes e *Kp* 34 apresentam taxas de multiplicação semelhantes, atingindo a fase estacionária de crescimento cerca de 270 min após o inóculo inicial. Enquanto que M67 iniciou sua fase estacionária 390 min após o inóculo (Figura 9).

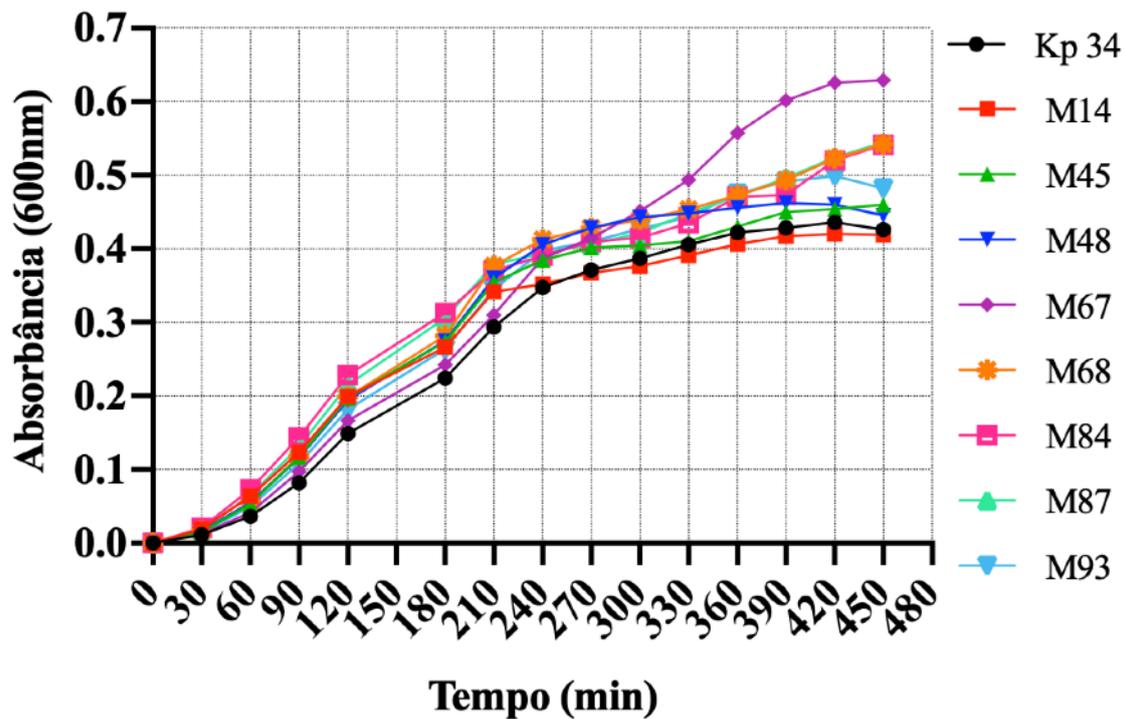


Figura 9. Curva de crescimento da linhagem selvagem (*Kp 34*) e dos mutantes (com inserção de *TnPhoA*) durante 450 min através de quantificação da absorbância à 600 nm.

3. Coloração com tinta nanquim para avaliar a presença da cápsula polissacarídica

A coloração com tinta nanquim foi utilizada para avaliar se durante a mutagênese as linhagens mutantes perderam apenas a capacidade de expressar o fenótipo de hiper mucoviscosidade ou se também perderam a cápsula. Os resultados estão apresentados na figura 10, em que podemos observar que todos os mutantes mantiveram suas cápsulas, já que é possível ver um halo transparente sobre o fundo mais escuro, o que representa a presença da cápsula.

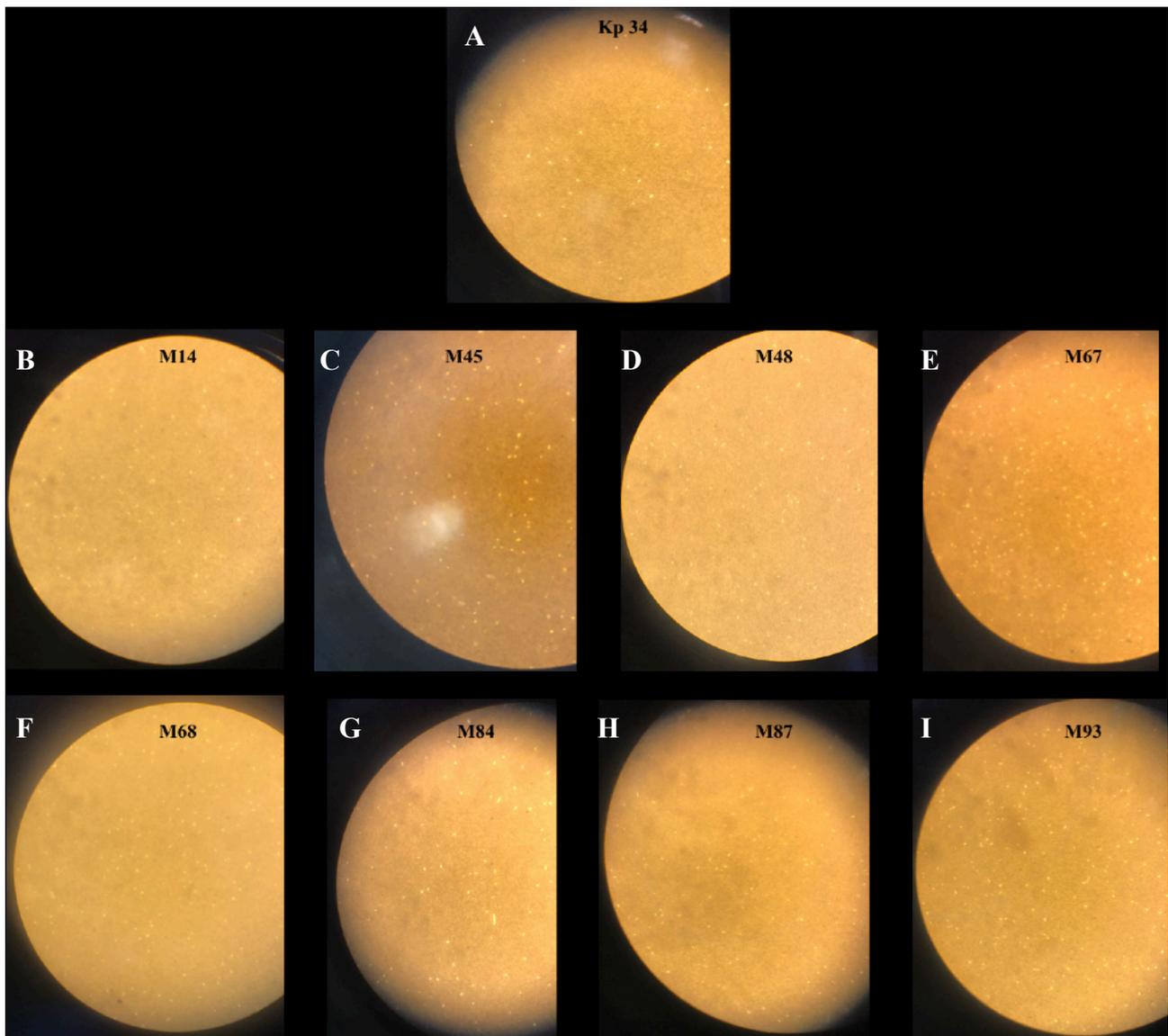
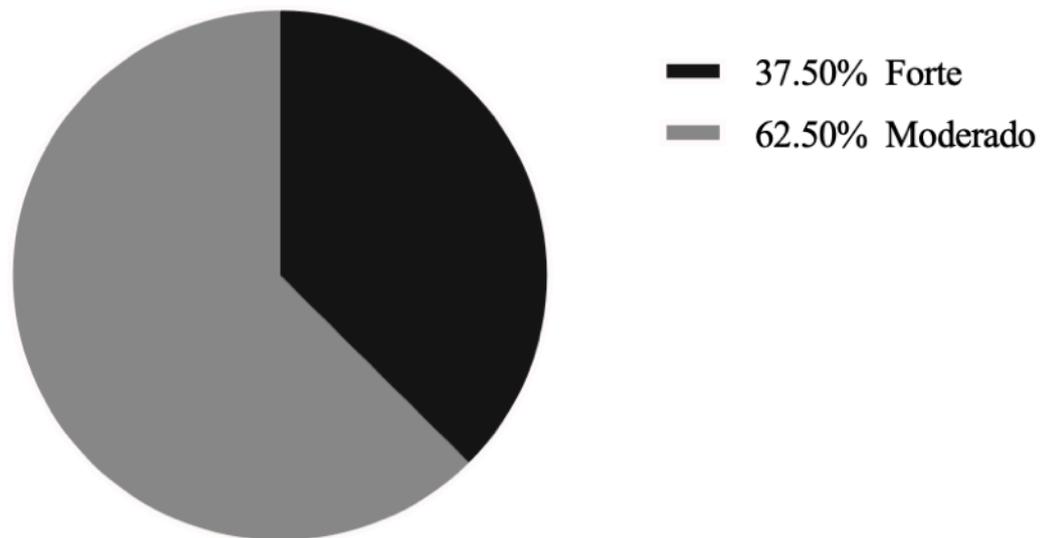


Figura 10. Visualização das linhagens de *Klebsiella pneumoniae* utilizadas neste estudo após coloração negativa com tinta nanquim. Aumento: 40x. A cápsula é identificada por um halo transparente sobre o fundo mais escuro. A figura A representa a linhagem selvagem Kp 34, enquanto as figuras B - I representam os mutantes.

4. Quantificação da produção de biofilme em superfície de poliestireno

A capacidade de produção de biofilme foi avaliada por método espectrofotométrico como descrito por Stepanovic *et al.* (2004). A linhagem selvagem (*Kp* 34) apresenta forte capacidade de produção de biofilme como demonstrado por De Campos *et al.* (2018) e também confirmado por ensaios realizados junto aos mutantes. M14, M48, M67, M68 e M84 possuem capacidade

moderada de produzir biofilme. Enquanto que M45, M87 e M93 apresentam forte capacidade de produção de biofilme. Com isso, 62,5% dos mutantes apresentaram moderada capacidade de produção de biofilme, enquanto que 37,5% apresentaram forte capacidade de produzir biofilme (Figura 11). A média dos valores das absorvâncias medidos durante o experimento durante os três dias diferentes estão apresentados na tabela 5.



Total = 8 mutantes

Figura 11. Avaliação da produção de biofilme em superfície de poliestireno pelos mutantes M14, M45, M48, M67, M68, M84, M87 e M93.

Tabela 5. Quantificação da produção de biofilme em superfície de poliestireno pelas linhagens *Kp* 34 (selvagem), M14, M45, M48, M67, M68, M84, M87 e M93.

	Média das Absorbâncias Dia 1	Média das Absorbâncias Dia 2	Média das Absorbâncias Dia 3	Média das Absorbâncias Dia 4	Resultado
<i>Kp</i>34	Forte	Moderado	—	Forte	Forte
M14	Moderado	Moderado	Forte	—	Moderado
M45	Forte	Forte	Forte	—	Forte
M48	Moderado	Moderado	Moderado	—	Moderado
M67	Forte	Moderado	Moderado	—	Moderado
M68	Forte	Moderado	Moderado	—	Moderado
M84	Moderado	Moderado	Moderado	—	Moderado
M87	Forte	Forte	Forte	—	Forte
M93	Forte	Forte	Moderado	—	Forte

5. Sobrevivência bacteriana em sangue e soro humanos

A capacidade das linhagens em sobreviver em sangue e soro humanos foi avaliada através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) após 0, 30, 60 e 120min de incubação em sangue ou soro, como descrito por DeLeo *et al.* (2017). Todas as linhagens apresentaram maior sobrevivência em soro do que em sangue. Os 8 mutantes e *Kp* 34 foram capazes de sobreviver em sangue humano, mas apenas *Kp* 34, M14 e M48 foram capazes de se multiplicar.

Já em soro humano, todos os mutantes e *Kp* 34 foram capazes de sobreviver e de se multiplicar (Figura 12). Até o tempo de 30min, todos os mutantes e *Kp* 34 se comportaram de forma semelhante, o que também aconteceu em sangue, com exceção de M14 e *Kp* 34. As linhagens M45, M48 e M67 apresentaram maior multiplicação celular do que os demais entre 30 e 60 min. A linhagem M87 apresentou uma multiplicação celular mais elevada em relação à todos os outros mutantes e à *Kp* 34, comportamento não observado em sangue. Além disso, M45, M48 e M67 apresentaram uma maior multiplicação celular do que M14, M68, M84,

M87 e *Kp* 34, apesar de M45 e M48 terem tido uma redução no número de suas colônias no tempo de 120min. Enquanto que M14, M67, M68, M84, M87, M93 e *Kp* 34 apresentaram um aumento no número de colônias em 120min de incubação.

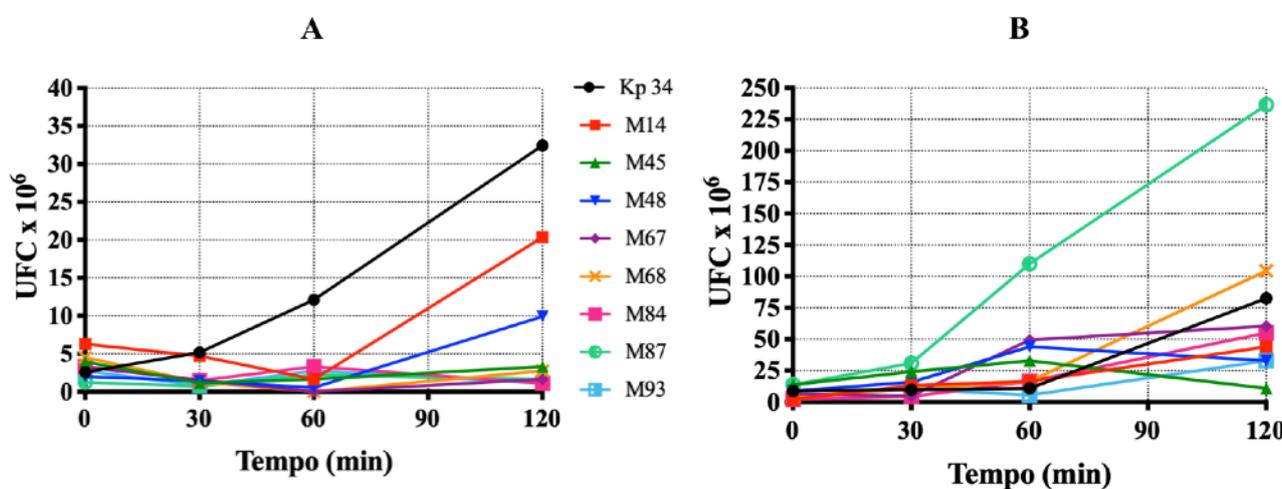


Figura 12. Unidades formadoras de colônias (UFCs) recuperadas após 0, 30, 60 e 120min de incubação das linhagens de *Klebsiella pneumoniae* em sangue (A) e soro (B) humanos.

6. Sobrevivência bacteriana no interior de células epiteliais HEP-2

Para a avaliação da sobrevivência das linhagens bacterianas em células epiteliais HEP-2, estas foram infectadas durante 24h pela linhagem selvagem (*Kp* 34) e pelos mutantes como descrito por (FAVRE-BONTE; JOLY; FORESTIER, 1999). Em seguida, as células foram lisadas e cultivadas em ágar MacConkey para contagem de UFC. Os resultados estão ilustrados na figura 13. Como podemos observar, foram recuperadas células bacterianas a partir de todas as infecções realizadas. A partir das células infectadas por *Kp* 34, foram recuperadas 559 UFCs. A partir das demais infecções foram recuperadas de 1077 a 2762 UFCs, sendo que o maior número de bactérias foi recuperado a partir de células infectadas por M67 (2762 UFCs). Em conjunto, estes dados demonstraram que todas as linhagens bacterianas analisadas foram capazes de sobreviver no interior de células epiteliais HEP-2.

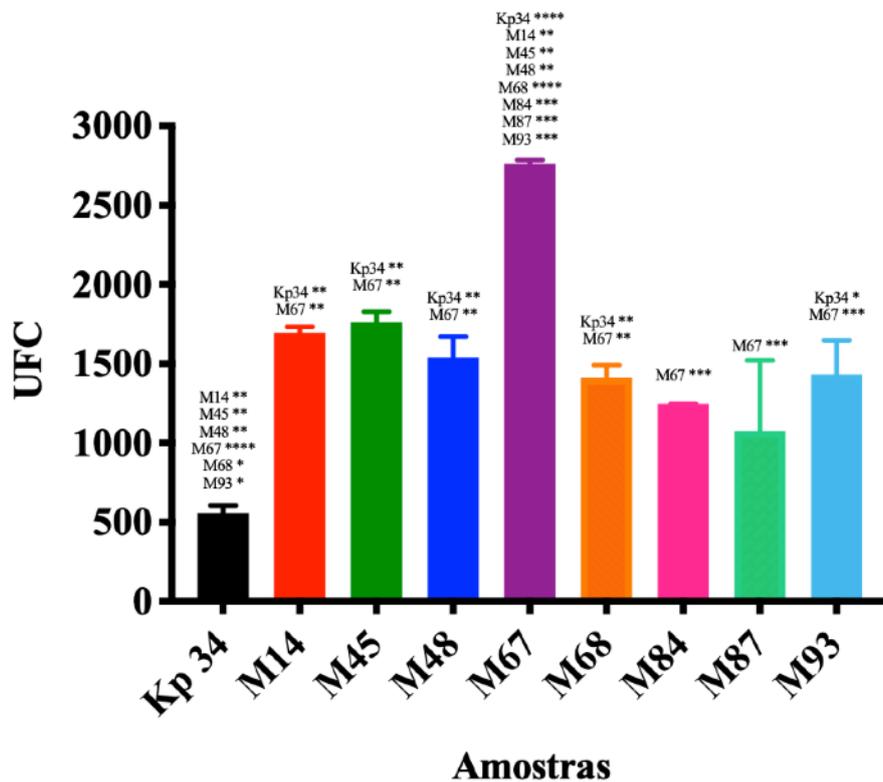


Figura 13. Unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas após 24h de infecção em células epiteliais HEp-2. O ensaio foi realizado em triplicata e o valor extremo de cada amostra foi retirado. O desvio padrão está representado no gráfico. As linhagens acompanhadas de asteriscos representam que houve diferenças significativas em relação à linhagem em questão. (*) representa $P \leq 0.05$, (**) representa $P \leq 0.01$, (***) ilustra $P \leq 0.001$ e (****) ilustra $P \leq 0.0001$ utilizando os testes estatísticos *One-way ANOVA* e *Turkey's multiple comparisons test*.

7. Quantificação da produção de NO por células epiteliais HEp-2 infectadas

A atividade microbicida da célula foi medida através da detecção indireta de óxido nítrico (NO) através do método de Griess após 24h de infecção com a linhagem selvagem (*Kp 34*) e com os mutantes, como descrito por (SHINN, 1941). As células infectadas por *Kp 34* apresentaram uma maior produção de NO (6,39 uM) do que aquelas infectadas pelos mutantes. Houveram diferenças significativas entre as células infectadas por *Kp 34* em relação àquelas infectadas por M67 (3,68 uM). Em relação aos mutantes, células infectadas por M45 (5,72 uM), M84 (5,46 uM) e M87 (5,45 uM) produziram significativamente mais NO do que aquelas infectadas por M67. Além disso, células não estimuladas com bactérias (NE) apresentaram

significativamente menor produção de NO (0,85 uM) do que àquelas que foram infectadas por *Kp 34* e pelos mutantes (Figura 14).

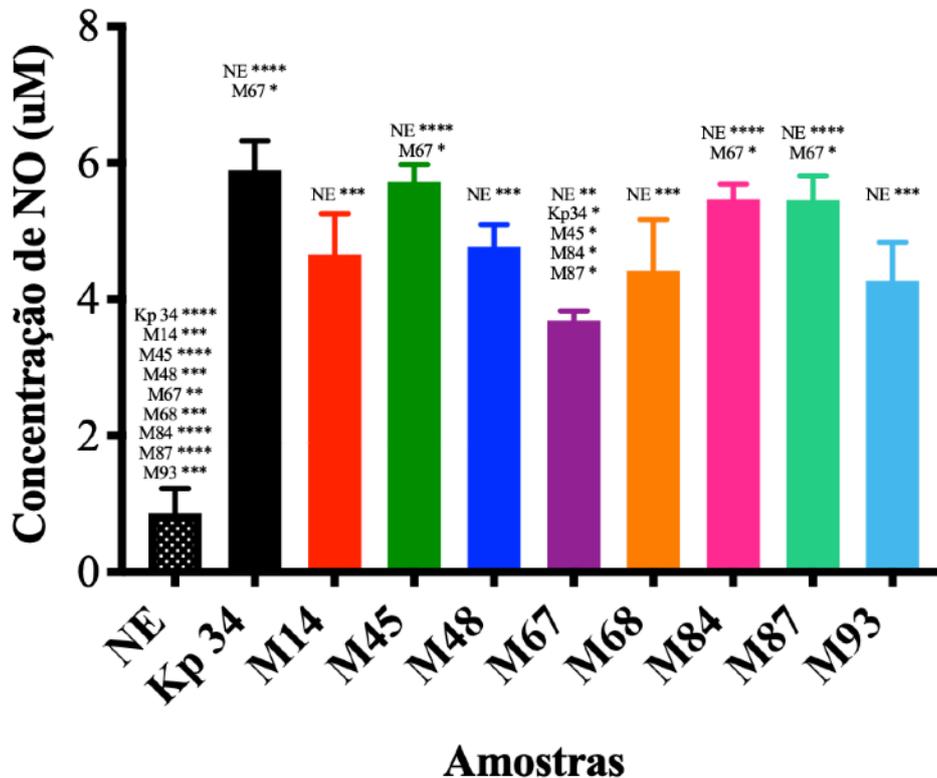
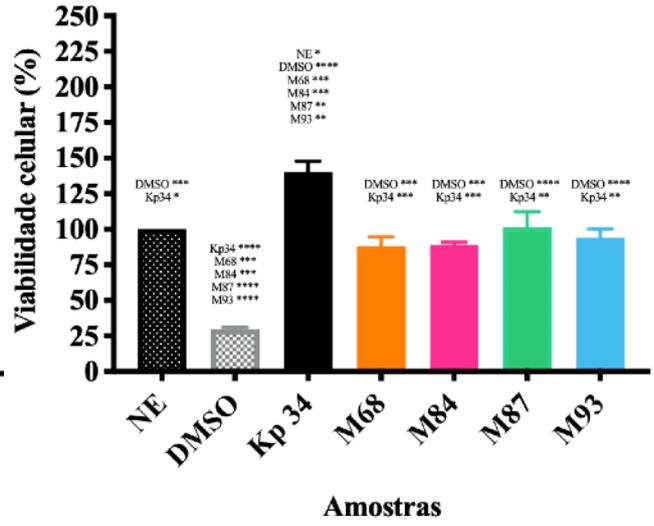
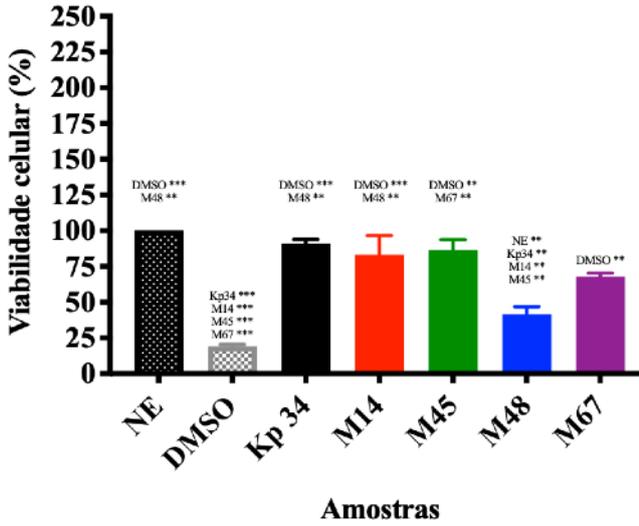


Figura 14. Quantificação da produção de NO em uM por células epiteliais HEP-2 infectadas durante 24h pela linhagem selvagem (*Kp 34*) e pelos mutantes. NE representa células não estimuladas por bactérias. O ensaio foi realizado em triplicata e o valor extremo de cada amostra foi retirado. O desvio padrão está representado no gráfico. As linhagens acompanhadas de asteriscos representam que houve diferenças significativas em relação à linhagem em questão. (*) representa $P \leq 0.05$, (**) representa $P \leq 0.01$, (***) ilustra $P \leq 0.001$ e (****) ilustra $P \leq 0.0001$ utilizando os testes estatísticos *One-way ANOVA* e *Turkey's multiple comparisons test*.

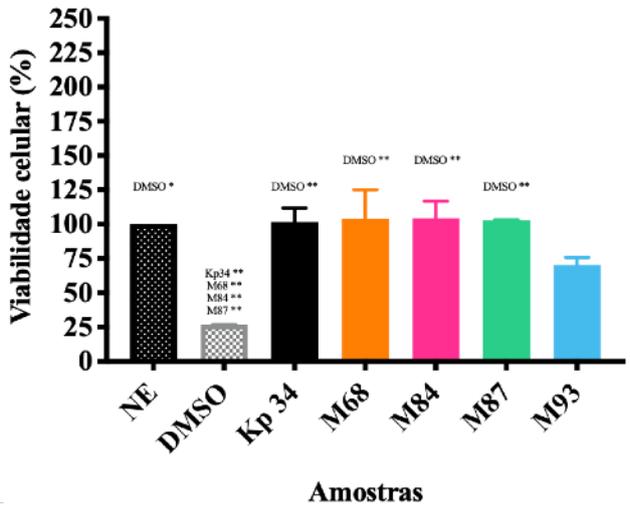
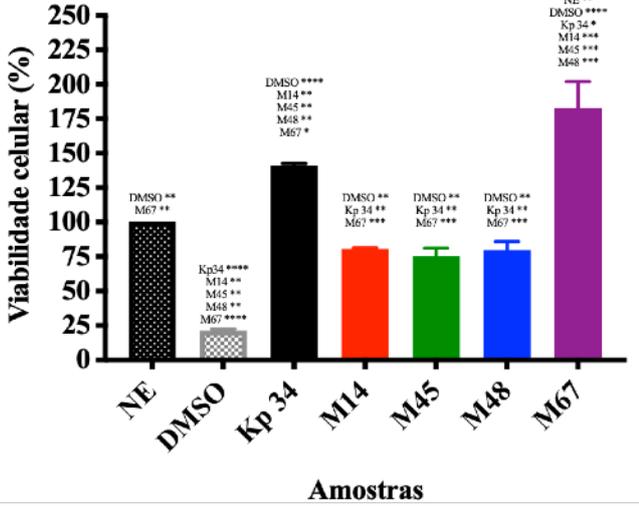
8. Avaliação da viabilidade de células epiteliais HEp-2 após infecção

A viabilidade celular foi medida através do método MTT como descrito por (MOSMANN, 1983). Em que ocorre a conversão do MTT em cristais de formazan por meio da ação de desidrogenases mitocondriais em células viáveis. Então, quanto maior a viabilidade celular, maior a redução do MTT e maior o sinal obtido no espectrofotômetro. DMSO foi utilizado como controle de morte e NE são células não estimuladas com bactérias, o que seria o controle positivo (100% de viabilidade). As células foram infectadas com a bactéria selvagem (*Kp* 34) e os mutantes nos tempos de 3h, 6h e 24h. Os resultados estão apresentados na figura 15. No tempo de 3h, células infectadas com *Kp* 34 apresentaram significativamente maior viabilidade celular do que M48, M68, M84, M87 e M93. Já no tempo de 6h, células infectadas por *Kp* 34 apresentaram significativamente maior viabilidade celular do que M14, M45 e M48, mas apresentaram menor viabilidade celular do que M67. Houve um aumento acentuado na viabilidade celular das células infectadas por M67 quando comparado ao tempo de 3h. No tempo de 24h, células infectadas por *Kp* 34 apresentaram significativamente maior viabilidade celular do que os 8 mutantes. Houve um aumento na viabilidade celular das células infectadas por *Kp* 34 quando comparado ao tempo de 6h.

3h



6h



24h

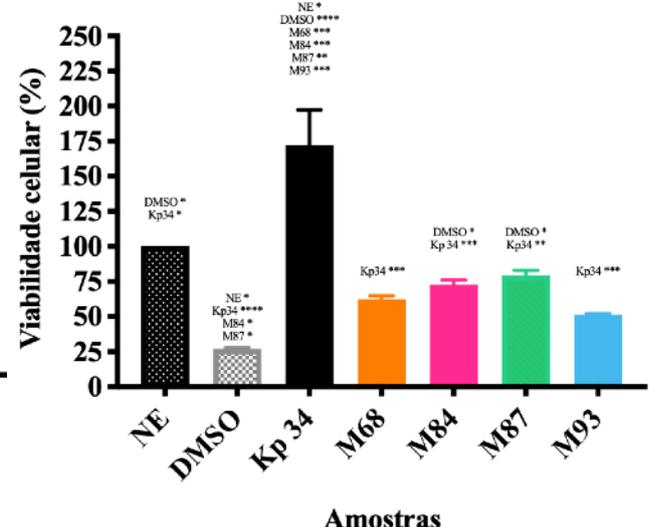
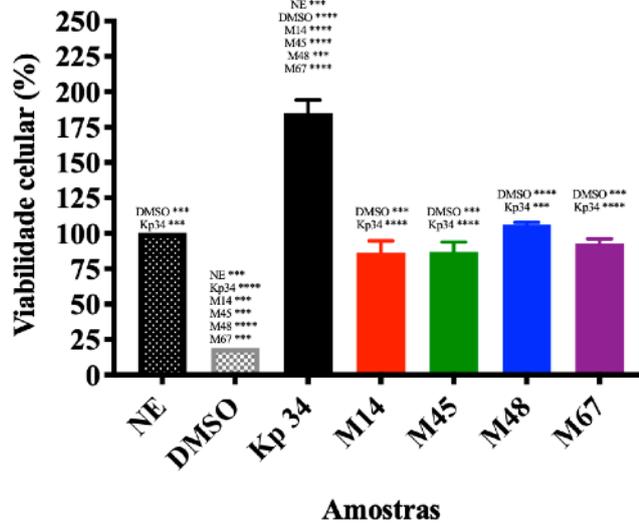


Figura 15. Viabilidade de células epiteliais HEp-2 infectadas com a linhagem selvagem (*Kp* 34) e com os mutantes nos tempos de 3h, 6h e 24h. A porcentagem de células viáveis é calculada usando como referência o controle de morte (DMSO 20%) e o controle de células viáveis que não foram estimuladas com bactérias (NE) (100% de viabilidade celular). O ensaio foi realizado em triplicata e o desvio padrão está representado no gráfico. As linhagens acompanhadas de asteriscos representam que houve diferenças significativas em relação à linhagem em questão. (*) representa $P \leq 0.05$, (**) representa $P \leq 0.01$, (***) ilustra $P \leq 0.001$ e (****) ilustra $P \leq 0.0001$ utilizando os testes estatísticos *One-way ANOVA* e *Turkey's multiple comparisons test*.

9. Quantificação da expressão de PPAR- γ por citometria de fluxo

Para avaliar a expressão de PPAR- γ em células epiteliais HEp-2 infectadas pela linhagem selvagem (*Kp* 34) e pelos mutantes por 24h, amostras previamente preparadas foram analisadas por citometria de fluxo. A análise foi feita com base na porcentagem de células positivas para PPAR- γ . Células positivas são aquelas que apresentaram eventos com mais fluorescência do que o controle não marcado com anticorpos. Os resultados mostram 60% de células positivas no controle não estimulado e 76,9% de células positivas infectadas por *Kp* 34. Células infectadas por M14, M45, M48, M67, M68, M84, M87 e M93 apresentaram 61,9%, 60,3%, 59,86%, 70,16%, 59,9%, 64,23%, 61,13% e 49,9% respectivamente. Mas os resultados não apresentaram diferenças significativas estatisticamente (Figura 16).

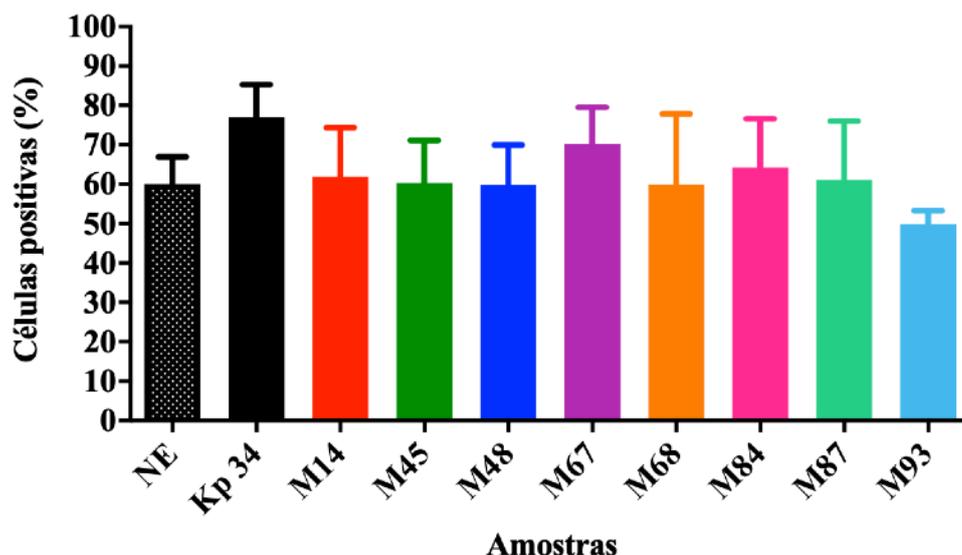


Figura 16: Porcentagem de células positivas para PPAR- γ . Células epiteliais HEp-2 infectadas por 24h com a linhagem selvagem (*Kp 34*) e os mutantes foram marcadas e analisadas por citometria de fluxo para avaliar a expressão de PPAR- γ . NE indica células não estimuladas com bactérias. O ensaio foi realizado em triplicata e o desvio padrão está representado no gráfico. Os testes estatísticos utilizados foram *One-way ANOVA* e *Turkey's multiple comparisons test*.

10. Identificação do sítio de inserção do transposon TnPhoA

PCRs foram realizadas com primers arbitrários e com primers específicos como explicitado nas tabelas 1 e 2, com o objetivo de identificar onde o transposon se inseriu e conseqüentemente, quais foram os possíveis genes interrompidos durante a mutagênese. Os géis de agarose contendo os produtos de PCR dos mutantes M14, M48, M67, M68, M84 e M93 estão ilustrados na figura 17.

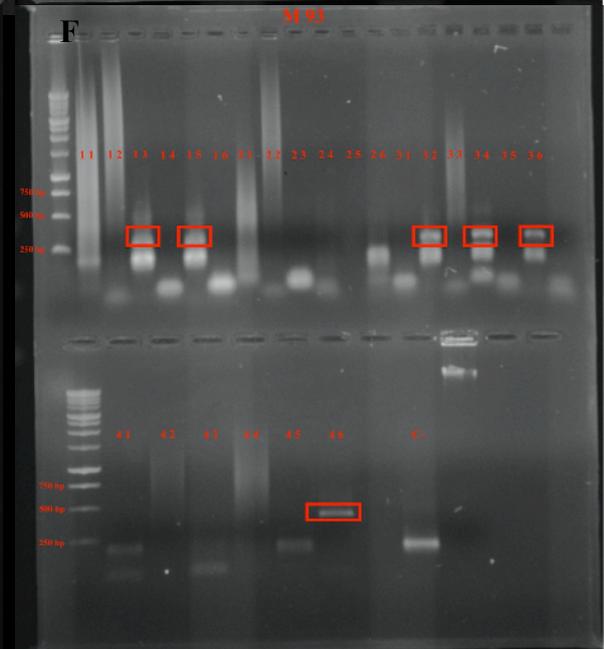
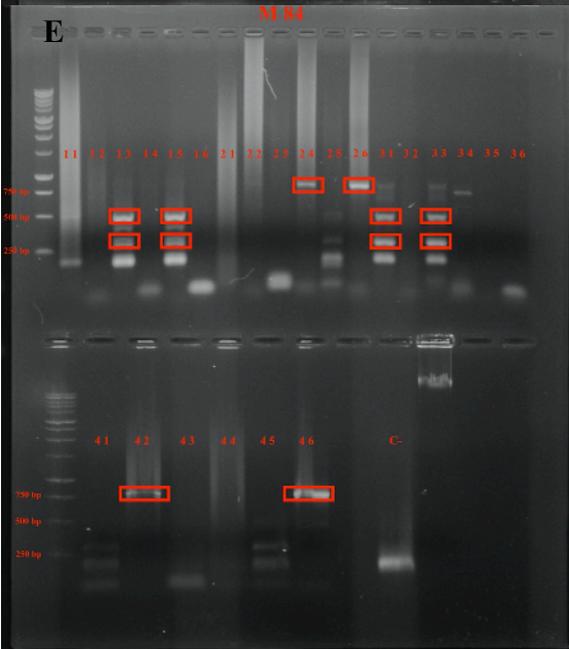
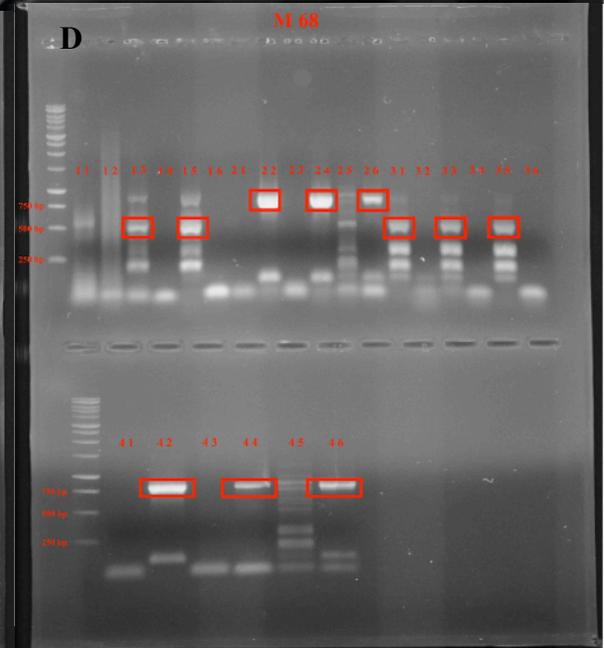
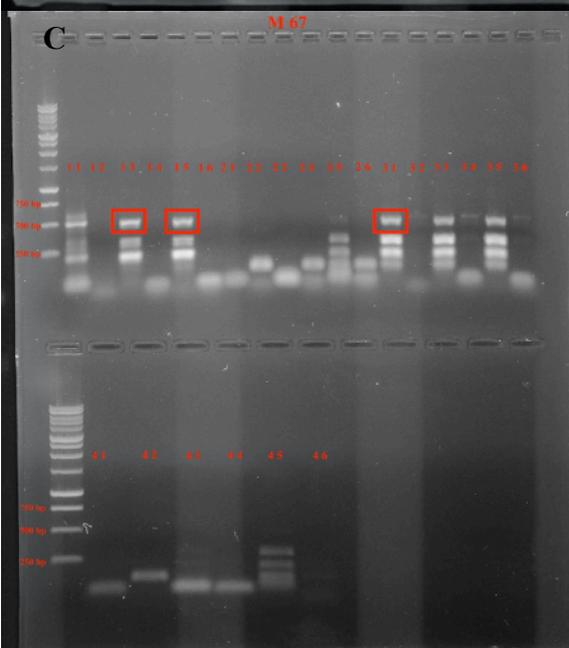
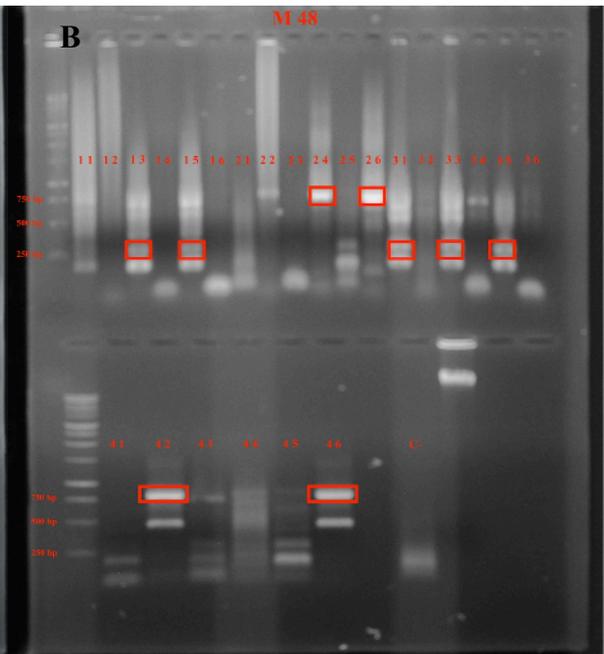
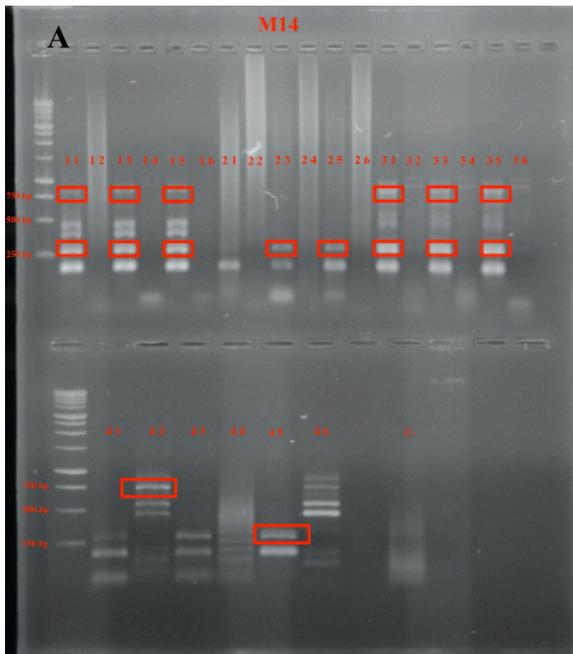


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos das PCRs com primers arbitrários e com primers específicos para as extremidades do transposon. Os números acima das bandas indicam a combinação de primers utilizadas, o primeiro número representa a combinação de primers do *round* 1 e o segundo número representa a combinação de primers do *round* 2 de acordo com as tabelas 1 e 2. Os retângulos vermelhos sinalizam as bandas que foram selecionadas para purificação a partir do gel e sequenciamento. O asterisco vermelho indica a banda relacionada ao DNA de cada mutante, que foi aplicado no gel para mostrar que este estava íntegro. O padrão de peso molecular utilizado foi *BenchTop 1kb DNA Ladder* (Promega). As letras A - F indicam os mutantes utilizados durante a PCR.

As bandas sinalizadas com retângulos vermelhos foram selecionadas, purificadas a partir do gel e enviadas para sequenciamento (Método de Sanger - Sequenciador ABI 3130xl da *AppliedBiosystems*) para que se pudesse obter um *screening* inicial dos possíveis genes que foram interrompidos durante a mutagênese e que podem estar relacionados com o fenótipo hmv (Tabela 6). Os dados de sequenciamento foram analisados pelo software *SnapGene Viewer* e pela plataforma BLASTx do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), então os resultados presentes na tabela 6 são relacionados à proteínas traduzidas a partir das sequências de nucleotídeos obtidas no sequenciamento.

Os resultados do sequenciamento demonstraram que no geral genes relacionados com o transporte de ferro e de sideróforos podem ter sido interrompidos, como: Proteína ligadora de ferricromo, transportador ABC de captação de quelante de ferro, Ferricromo permease de transportador ABC e ferro permease de transportador ABC. Além de genes relacionados com transportadores ABC, proteínas ligadoras de ATP, L-Fucose isomerase, sistemas de efluxo RND, transposases e proteínas de elementos móveis.

Tabela 6: *Screening* inicial de proteínas relacionadas a possíveis genes interrompidos durante a mutagênese.

Isolado bacteriano (primer)	Proteína (código de acesso)
M14 (Tn903-3)	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína ligadora de ferricromo (AHM79102.1) - Sistema de transporte ABC (BAH63817.1) - Transportador ABC de captação de quelante de ferro (WP_134929576.1) - Preproteína translocase YidC (APV14161.1) - Proteína ligadora de transportador ABC (WP_014343159.1)
M14 (Tn903-3)	<ul style="list-style-type: none"> - L-Fucose isomerase (SBG98964.1)
M14 (REP1)	<ul style="list-style-type: none"> - Ferricromo permease de transportador ABC (SQC36570.1) - Ferro permease de transportador ABC (PLP03795.1)
M14 (Tn903-4)	<ul style="list-style-type: none"> - Sistema de efluxo RND (STW71484.1) - Sistema de efluxo RND (SMB49505.1)
M48 (Tn903-3)	<ul style="list-style-type: none"> - L-Fucose isomerase (SQC15319.1) - L-Fucose isomerase (STU61846.1)
M48 (Tn903-4)	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína ligadora de ATP de transportador ABC LivF (WP_131073939.1) - ATPse de transportador ABC (STT82681.1) - Proteína ligadora de ATP (WP_142387618.1)
M48 (Tn903-4)	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína ligadora de ATP de transportador ABC LivF (WP_101987001.1) - Proteína ligadora de ATP de transportador ABC LivF (CEP74339.1)
M67 (Tn903-3)	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína de elemento móvel (CDL53513.1) - Transposase da família IS5 (WP_004181740.1)
M67 (Tn903-3)	<ul style="list-style-type: none"> - Transposase (SLS71304.1) - Transposase (WP_131135855.1) - Proteína de elemento móvel (CDL53513.1) - IS5 family transposase (WP114140900.1)
M68 (Tn903-3)	<ul style="list-style-type: none"> - Transposase putativa (VCX63218.1) - Proteína de elemento móvel (CDK75586.1) - Transposase da família IS5 (WP_140414677.1)
M68 (Tn903-4)	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína ligadora de ATP LivF (CDL61189.1) - Proteína ligadora de ATP (WP_117041845.1)

M68 (Tn903-4)	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína ligadora de ATP (RCI93640.1) - Proteína ligadora de ATP de transportador ABC (Pjg97767.1) - Proteína ligadora de ATP de transportador ABC LivF(WP_074423169.1)
M84 (ARB2)	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína de elemento móvel (CDL52560.1) - Transposase (WP_142777130.1) - Transposase da família IS5 (WP_135713404.1)
M84 (Tn903-3)	<ul style="list-style-type: none"> - Transposase (WP_134083582.1) - Transposase da família IS5 (WP_109233482.1) - Transposase da família IS5 (WP_142369450.1)
M84 (REP1)	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína GspL Sistema de secreção do tipo II (WP_099451073.1)
M84 (Tn903-4)	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína ligadora de ATP de transportador ABC LivF (WP_109232738.1)
M84 (ARB2)	<ul style="list-style-type: none"> - L-Fucose isomerase (STU61728.1)
M84 (Tn903-4)	<ul style="list-style-type: none"> - L-Fucose isomerase (PLP40960.1)
M93 (Tn903-3)	<ul style="list-style-type: none"> - L-Fucose isomerase (SQC15319.1)

VI. Discussão

O foco deste trabalho foi avaliar o papel do fenótipo de hiper mucoviscosidade na patogenicidade de uma linhagem de *K. pneumoniae*. Linhagens mutantes que não possuem este fenótipo foram avaliadas junto à linhagem selvagem com relação à taxa de multiplicação celular (curva de crescimento), presença de cápsula, produção de biofilme, crescimento em sangue e soro humanos, sobrevivência no interior de células epiteliais, citotoxicidade e produção de NO por essas células. Além disso, a expressão de PPAR- γ em células epiteliais infectadas pelos mutantes e pela linhagem selvagem foi avaliada através de citometria de fluxo. Posteriormente, um *screening* inicial dos possíveis genes interrompidos durante a mutagênese foi realizado através de AP-PCRs seguidas de sequenciamento.

Mutagênese e teste de hiper mucoviscosidade

A utilização de transposons durante o processo de mutagênese para identificar genes responsáveis por características diversas de microrganismos, como fatores de virulência, tem se tornado muito comum. Esta técnica foi utilizada por Maroncle *et al.* (2002) e por Struve; Forestier; Krogfelt (2003) para identificar genes envolvidos na colonização de *K. pneumoniae* no intestino. Assim como, Boddicker *et al.* (2006) utilizaram esta abordagem para identificar genes relacionados com a produção de biofilme em linhagens de *K. pneumoniae*.

A ideia se baseia em utilizar uma linhagem que possui um plasmídeo com o transposon específico para realizar uma conjugação com a bactéria de interesse. Neste caso, a linhagem *E. coli* SM10 com o plasmídeo pRT733 que possui o transposon TnPhoA foi utilizada em um processo de conjugação com *K. pneumoniae* (*Kp* 34). Desta forma, o plasmídeo se inseriu aleatoriamente no genoma de *Kp* 34 e as bactérias mutagenizadas foram selecionadas com os antibióticos cloranfenicol e canamicina. Aqueles mutantes que testaram negativo para o fenótipo de hiper mucoviscosidade através do *string test* foram selecionados para o trabalho. Desta forma, foi possível avaliar o papel da hiper mucoviscosidade na patogenicidade desta linhagem.

Curvas de crescimento

A linhagem *Kp* 34 foi obtida a partir de *swab* nasal de um paciente do Hospital Universitário de Brasília. Um estudo anterior realizado por De Campos *et al.* (2008) demonstrou que este isolado possui sorotipo capsular K64, genes de resistência como *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SHV-11}, dentre outros. Sendo assim, esta é considerada uma linhagem extensivamente resistente à antibióticos (XDR), ou seja, esta é resistente a pelo menos um antibiótico de todas as categorias, com exceção de uma ou duas classes de antimicrobianos. Além de apresentar genes para o sideróforo yersiniabactina e para fímbrias do tipo 3, alta capacidade de produzir biofilme, sobrevivência em sangue e soro humanos, habilidade de invasão e sobrevivência no interior de células epiteliais e citotoxicidade. Apesar disso, esta não possui outros marcadores de virulência como genes *rmpA/rmpA2* que estão normalmente associados com o fenótipo de hiper mucoviscosidade.

Para avaliar se o fenótipo de hiper mucoviscosidade afeta a multiplicação desta linhagem, curvas de crescimento dos mutantes (não produtores do fenótipo) e de *Kp* 34 foram realizadas (Figura 9). Todos os mutantes, com exceção de M67, apresentaram taxas de multiplicação semelhantes à *Kp* 34. M67 apresentou maior taxa de multiplicação, o que demonstra que a ausência do fenótipo hmv proporcionou uma maior capacidade de multiplicação *in vitro* para M67, mas não afetou os demais mutantes quando comparados à *Kp* 34.

A perda de fatores de virulência pode estar relacionada com a diminuição do crescimento da bactéria, como ocorreu em linhagens de *K. pneumoniae* que tiveram os genes *ompK35* e *ompK36* (relacionados à porinas) deletados. A complementação destes genes restaurou a capacidade de crescimento destas linhagens (TSAI *et al.*, 2011). Além disso, como ferro é muito importante para o crescimento de *K. pneumoniae*, deleções ou interrupções em genes relacionados à sideróforos também podem afetar o crescimento bacteriano em situações onde a concentração de ferro é limitada, como em infecções em humanos (LAWLOR; O'CONNOR, MILLER, 2007) (RUSSO *et al.*, 2015). Pomakova *et al.* (2011) demonstraram que o crescimento de linhagens cKP e hvKP em meio LB é semelhante.

A linhagem selvagem (*Kp* 34) apesar de não possuir marcadores de virulência tradicionalmente relacionados com a hipervirulência, como sorotipo K1 ou K2 e genes *rmpA/rmpA2*, apresenta características de alta patogenicidade. Assim, esta pode ser uma linhagem hv/hmKP, mas mais testes são necessários para confirmar esta hipótese (DE CAMPOS *et al.*, 2018). Como nós estamos avaliando linhagens mutantes, que não são naturalmente negativas para o fenótipo hmv, e o transposon se inseriu em sítios aleatórios do genoma da linhagem selvagem, possivelmente interrompendo diferentes genes que estão relacionados ao fenótipo hmv, a fisiologia de M67 pode ter sido alterada, conferindo à ela uma maior capacidade de multiplicação *in vitro*. Além disso, como a bactéria não gasta energia expressando os genes relacionados à este fenótipo, esta pode utilizá-la para atingir um maior multiplicação *in vitro*.

Presença da cápsula polissacarídica

A cápsula é um fator de virulência extremamente relevante para *K. pneumoniae*, sendo importante para a sobrevivência e multiplicação bacteriana, por conferir proteção às ações do sistema imune do hospedeiro, principalmente contra opsonização e lise bacteriana mediadas pelo sistema complemento e fagocitose por macrófagos (PACZOSA; MECSAS, 2016). Além de proteger a bactéria contra peptídeos antimicrobianos e ajudar na evasão do sistema imune (LI *et al.*, 2014). Para garantir que a mutagênese afetou genes relacionados à expressão do fenótipo hmv mas não impediu os mutantes de produzirem a cápsula polissacarídica, coloração com tinta nanquim foi realizada e os resultados foram avaliados por microscopia óptica (Figura 10). Como todos os mutantes e a linhagem selvagem apresentaram um halo transparente sobre o fundo mais escuro, concluímos que a mutagênese não afetou a capacidade de produção da cápsula, ou seja, todas as linhagens analisadas neste trabalho mantiveram sua cápsula, apesar dos mutantes terem perdido a capacidade de expressar a hipermucoviscosidade.

Produção de biofilme

A capacidade de produção de biofilme foi avaliada e os resultados demonstraram que 62,5% dos mutantes apresentam capacidade moderada de produção de biofilme, enquanto que 37,5% apresentam forte capacidade de produzir biofilme (Figura 11), assim como a linhagem selvagem (*Kp* 34). Assim, a mutagênese pode ter afetado a capacidade dos mutantes M14, M48, M67, M68 e M84 em produzir biofilme. Shah *et al.* (2017) demonstraram que linhagens hvKP possuem maior capacidade de produzir biofilme do que cKP. Neste estudo, o método utilizado para diferenciar linhagens cKP e hvKP foi o *string test*, o que quer dizer que de acordo com trabalhos mais recentes, estas são na realidade linhagens hmKP que precisariam de mais estudos para confirmar se também apresentam hipervirulência (RUSSO; MARR, 2019). Com isso, este estudo demonstra na realidade que linhagens hmKP produzem mais biofilme do que linhagens negativas para o fenótipo de hiper mucoviscosidade, corroborando o que nossos resultados demonstraram, a perda do fenótipo hmv afetou a produção de biofilme em grande parte dos mutantes. Contrariamente, estudos feitos por Zheng *et al.* (2018) e por Soto *et al.* (2017) mostraram que não ocorre maior produção de biofilme em linhagens que expressam este fenótipo em comparação àquelas que não o expressam.

A diferença na produção de biofilme entre os mutantes e a linhagem selvagem variou entre moderada e forte. Uma hipótese para que esta não tenha sido tão drástica é que a cápsula é um fator importante para a formação de biofilme, como todos os mutantes a mantiveram, biofilme continuou a ser formado de forma eficiente por todos eles. O que é importante para a bactéria, já que a formação de biofilme as protege contra radiação UV, desidratação e fagocitose, além de facilitar a troca de material genético e contribuir para a resistência à antimicrobianos (MADIGAN *et al.*, 2016). Além disso, Wu *et al.* (2011) demonstraram que a formação de biofilme é importante para a patogenicidade de *K. pneumoniae* pois contribui para o estabelecimento de infecções no trato gastrointestinal. Apesar disso, os resultados de Kong *et al.* (2012) mostram que a formação de biofilme não parece ser importante para proteger o patógeno do sistema complemento do hospedeiro.

Sobrevivência em sangue e soro humanos

Para avaliar se o fenótipo hmv afeta a capacidade da linhagem Kp 34 em sobreviver em sangue e soro humanos, linhagens mutantes e a linhagem selvagem (Kp 34) foram incubadas em sangue e soro humanos e UFCs foram contabilizadas após 0, 30, 60 e 120min de incubação (Figura 12). Todas os mutantes e a linhagem selvagem apresentaram maior taxa de multiplicação celular em soro do que em sangue humano. O que provavelmente ocorreu devido ao fato do sangue possuir células que estão relacionados com o sistema imune, enquanto o soro possui apenas sistema complemento. Kp 34 se multiplicou mais em sangue humano quando comparado aos mutantes. Apesar disso, todos foram capazes de sobreviver, mas apenas Kp 34, M14, M45 e M48 foram capazes de se multiplicar. Estes resultados estão de acordo com Soto *et al.* que demonstraram que linhagens hmKP sobrevivem mais em sangue do que àquelas que não expressam o fenótipo hmv. Estes dados podem indicar que este fenótipo é importante para infecções como bacteremia, que foi a causa de morte do paciente do qual Kp 34 foi isolada. Apesar de Kp 34 ter sido obtida de swab nasal, outros dois isolados foram obtidos deste mesmo paciente, sendo um deles, isolado de sangue. Após testes como MLST e ERIC-PCR descobriu-se que os três representavam a mesma linhagem (DE CAMPOS *et al.*, 2018). Em contrapartida, em um estudo feito por Lin *et al.* (2011), uma linhagem não hiper mucoviscosa foi responsável por causar bacteremia em mais camundongos diabéticos quando comparada à uma linhagem hmKP.

Com relação à sobrevivência em soro, todos os mutantes e Kp 34 foram capazes de sobreviver e de se multiplicar, sendo que M87 apresentou uma capacidade bem mais elevada de se multiplicar em soro do que Kp 34 e os demais mutantes. Contrariamente à estes resultados, Cox *et al.* (2015) e Fang *et al.* (2004) demonstraram uma redução da sobrevivência em soro de linhagens que não expressam o fenótipo hmv, quando comparado à linhagens hmKP. Além disso, estudos feitos por Fang *et al.* (2004) e Pomakova *et al.* (2012) mostraram que linhagens hvKP são mais resistentes ao soro do que cKP. A cápsula é importante para proteger a bactéria do sistema complemento, pois esta diminui a deposição de C3 que pode gerar lise bacteriana e é responsável pela opsonização do patógeno. Então,

esperava-se que um aumento na produção de polissacarídeos capsulares caracterizando o fenótipo hmv, gerasse maior resistência bacteriana ao sistema complemento. Mas nossos resultados demonstraram que o fenótipo hmv parece não estar explicitamente associado à sobrevivência em soro humano *in vitro* para esta linhagem. Outra explicação, para a resistência destas bactérias ao sistema complemento presente no sangue e soro humanos, é que as moléculas de LPS presentes nesta linhagem possuam antígenos O com maior comprimento. Com isso, estes ficariam expostos mesmo com a presença de cápsula, mas impediriam que o sistema complemento exercesse seus efeitos, pois C3b iria interagir com antígeno O distante da membrana externa, impedindo a formação de C5b e conseqüentemente, a opsonização e a formação de poros na membrana da bactéria (MERINO *et al.*, 1992). Além disso, o antígeno O dificulta a interação entre C1q e a superfície da bactéria, impedindo a ação do sistema complemento (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Sobrevivência e citotoxicidade em células epiteliais HEp-2 e produção de NO por HEp-2

A sobrevivência da linhagem selvagem (*Kp* 34) e dos mutantes em células epiteliais HEp-2 foi avaliada através da contagem de UFC após 24h de infecção. Sabe-se que *K. pneumoniae* pode ser internalizada por células não fagocíticas, mas nós queríamos avaliar se o fenótipo hmv poderia afetar este processo de alguma forma. Os resultados demonstraram que todos mutantes, com exceção de M84 e M87, sobreviveram significativamente mais que *Kp* 34 no interior dessas células, o que indica que o fenótipo hmv provavelmente não é essencial para que a bactéria invada e sobreviva em células epiteliais (Figura 13). M67 é o mutante que mais sobreviveu no interior dessas células e também é o que apresenta maior taxa de multiplicação em meio LB (Figura 9). Sahly *et al.* (2000), Favre-Bonte; Joly; Forestier (1999) e Struve; Krogfelt (2002) demonstraram que linhagens capsuladas aderem e invadem menos células epiteliais quando comparado com àquelas que não possuem cápsula. Além disso, um aumento da expressão de material capsular também resultou em menor capacidade de invadir células epiteliais (SAHLY *et al.*, 2000). Como esse fenótipo

pode estar relacionado com uma maior expressão de polissacarídeos capsulares, nossos resultados estão de acordo com os estudos citados acima, já que os mutantes que não expressam o fenótipo de hipermucoviscosidade podem possuir menos material capsular, o que facilitaria a adesão e invasão em células HEP-2. Uma das explicações para este comportamento é que a cápsula pode mascarar as adesinas presentes na bactéria, dificultando a interação destas com os receptores presentes nas células epiteliais. Outra explicação seria que precursores de cápsula ou elementos regulatórios podem interferir na maturação de fímbrias e na expressão de adesinas (MATATOV *et al.*, 1999). Além disso, células epiteliais não expressam receptores para manose, componente presente na cápsula de *K. pneumoniae*, estes receptores são encontrados em células fagocíticas e permitem que a bactéria seja fagocitada (SAHLY *et al.*, 2000). Porém, Favre-Bonte; Joly; Forestier (1999) demonstraram que bactérias capsuladas aderem mais que as não capsuladas à células que produzem muco.

Com relação à citotoxicidade, todos os mutantes foram mais citotóxicos para células epiteliais após 3h de infecção, havendo diferenças significativas entre *Kp* 34 e os mutantes M48, M68, M84, M87, M93. No tempo de 6h, apenas os mutantes M14, M45 e M48 apresentaram significativamente maior citotoxicidade para as células do que *Kp* 34. Um aumento na viabilidade de células infectadas por M67 foi observado, mas este não persistiu após 24h de infecção, em que todos os mutantes apresentaram significativamente maior citotoxicidade para as células do que *Kp* 34 (Figura 15). Esses resultados nos mostram que o fenótipo hmv não aparenta ser crucial para a citotoxicidade dessa linhagem bacteriana. Esses dados estão de acordo com estudos feitos por Cano *et al.* (2009) que mostram que *K. pneumoniae* é citotóxica para células epiteliais. Em muitas bactérias, a citotoxicidade depende da ação do sistema de secreção do tipo III, mas não foram encontrados genes relacionados à este sistema em linhagens de *K. pneumoniae*. Então, é provável que o efeito citotóxico ocorra devido à vesículas de membrana externa, que podem ser produzidas por *K. pneumoniae* e entregam toxinas para a célula hospedeira, como ocorre com *P. aeruginosa* (BOMBERGER *et al.*, 2009) e *E. coli* (KESTY *et al.*, 2004).

Além disso, a cápsula é importante para este efeito citotóxico, pois linhagens sem cápsula não o apresentaram. Mas esta não é a única responsável pela citotoxicidade, outros elementos também contribuem para o efeito citotóxico de *K. pneumoniae* em células epiteliais (CANO *et al.*, 2009). Como todos os mutantes mantiveram a cápsula, perdendo apenas a capacidade de expressar o fenótipo de hipermucoviscosidade, estes não perderam sua capacidade citotóxica, esta na realidade foi significativamente aumentada. Se a expressão deste fenótipo ocorrer realmente devido a maior produção de polissacarídeos capsulares, estes resultados contrariam dados de Cano *et al.* (2009) que indicam que o efeito citotóxico não é completamente dependente da quantidade de componentes capsulares expressos. Porém, uma possível hipótese para esse comportamento é que os mutantes podem estar utilizando a energia que estaria voltada para a expressão da hipermucoviscosidade para potencializar outros fatores de virulência, permitindo assim, que estes sobrevivam e sejam mais tóxicos para células epiteliais do que a linhagem selvagem (*Kp* 34).

Por outro lado, uma menor citotoxicidade indica que a bactéria poderá utilizar essas células como hospedeiro por mais tempo, utilizando os meios fornecidos por estas para sobreviver e se multiplicar. Se a bactéria for muito citotóxica, esta acaba matando a célula e conseqüentemente, perdendo seu hospedeiro. Apesar de *K. pneumoniae* não ser um parasita intracelular obrigatório, esta é capaz de invadir e sobreviver no interior de células epiteliais. Então, dependendo da estratégia para sobrevivência bacteriana, o fenótipo de hipermucoviscosidade pode ser relevante para que não haja uma citotoxicidade aumentada (como observado nos mutantes), mantendo assim mais células vivas para que a bactéria também sobreviva no interior destas. Além disso, essa hipótese também explicaria o fato de algumas células infectadas apresentarem maior viabilidade celular do que àquelas não estimuladas. Já que a bactéria não pode matar seu hospedeiro se quiser continuar obtendo nutrientes a partir deste e sobrevivendo em seu interior.

O óxido nítrico possui função importante no combate à infecções bacterianas devido à reação de NO com superóxido que gera danos à células alvo ou devido à reação com grupos tiol ou ferro, o que gera inativação de enzimas bacterianas (TSAI

et al., 1997). NO é formado graças à ação de óxido nítrico sintases (NOS), existem três isoformas desta enzima, mas a mais relevante neste caso é a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que é expressa em resposta à estímulos, como o de citocinas pró-inflamatórias. Apesar de ser importante para combater infecções bacterianas, um excesso de NO pode causar sepse (BURGNER; ROCKETT; KWIATKPWSKI, 1999).

A atividade microbicida de células epiteliais HEp-2 foi avaliada através da quantificação de NO após infecção por 24h com a linhagem selvagem (*Kp* 34) e os mutantes. Tsai *et al.* (1997) demonstraram que células infectadas com *K. pneumoniae* possuem expressão de NO aumentada e que esta molécula tem papel importante como mediador de fagocitose por macrófagos e *clearance* bacteriano. Células infectadas por *Kp* 34 e os mutantes produziram significativamente mais NO do que células não estimuladas com bactérias. Além disso, *Kp* 34 induziu a produção de mais NO do que o mutante M67, que apresentou a menor capacidade de induzir a produção desta molécula. Com isso, o fenótipo de hipermucoviscosidade aparenta ter importância para a indução da produção de NO em células epiteliais HEp-2, já que o mutante M67 que perdeu a capacidade de expressar a hipermucoviscosidade apresentou menor capacidade de induzir NO quando comparado à *Kp* 34, que possui este fenótipo.

Esses resultados nos mostram que os mutantes são mais citotóxicos para células epiteliais do que a linhagem selvagem (*Kp* 34). Além de também serem capazes de sobreviver significativamente mais no interior dessas células no tempo de 24h quando comparado à *Kp* 34. Ademais, a menor capacidade de sobrevivência de *Kp* 34 provavelmente ocorre pois esta induz maior produção de NO do que os mutantes, o que auxilia no combate à bactéria, tornando-a menos eficaz em se multiplicar nessas células. M67 é o mutante que mais sobreviveu no interior das células epiteliais, possivelmente porque este é o que menos induz a produção de NO, permitindo que esta bactéria tenha sucesso se multiplicando neste tipo celular. Porém, é importante ressaltar que tanto *Kp* 34 quanto os mutantes foram capazes de sobreviver e de se multiplicar em células epiteliais mesmo na presença de NO, o que

indica que esta linhagem apresenta certa resistência à este mecanismo microbicida e que a perda do fenótipo de hiper mucoviscosidade não impactou nesta resistência.

Os resultados observados estão de acordo com estudos feitos por Workman *et al.* (2017) que mostram que *K. pneumoniae* precisa de níveis altos de NO para que esta molécula afete seu crescimento. Isso pode ser explicado devido ao fato de *K. pneumoniae* ser normalmente uma bactéria comensal, então NO pode controlar sua proliferação, mas não é eficiente em eliminar completamente a bactéria. Enquanto que a presença de microrganismos como *P. aeruginosa* normalmente indica doença, então estas bactérias são mais sensíveis aos efeitos de NO. Além disso, NO é uma molécula que normalmente afeta o crescimento bacteriano para que outros mecanismos do sistema imune possam combater a infecção, não sendo eficaz para matar a bactéria em alguns casos.

Expressão de PPAR- γ por células epiteliais HEp-2

PPAR- γ possui um papel duplo durante infecções bacterianas, pois este é importante para o combate dessas infecções, modulando a resposta inflamatória e auxiliando no clearance bacteriano. Mas por outro lado, a expressão de PPAR- γ também pode afetar a migração de granulócitos e gerar apoptose de macrófagos (ARONOFF *et al.*, 2007) (ASADA *et al.*, 2004) (REDDY *et al.*, 2008) (BODLES *et al.*, 2006). Devido à isso, nós decidimos verificar se a perda do fenótipo hmv afeta a expressão desse fator. Para este fim, células epiteliais infectadas pela linhagem selvagem (*Kp* 34) e pelos mutantes durante 24h foram avaliadas quanto à expressão de PPAR- γ por citometria de fluxo. A expressão de PPAR- γ é aumentada durante infecção de macrófagos por *Mycobacterium* (STAVRUM *et al.*, 2011) e por *Listeria monocytogenes* (ABDULLAH *et al.*, 2012), além de infecções de células epiteliais por *Salmonella* (KELLY *et al.*, 2004). Além disso, a presença de PPAR- γ em macrófagos dificulta o clearance bacteriano, auxiliando o patógeno a evadir das ações do sistema imune devido à seu papel anti-inflamatório. Ademais, a presença de PPAR- γ também auxilia o patógeno durante a infecção pois este fator inibe a

produção de NO, que é uma molécula com funções bactericidas (ABDULLAH *et al.*, 2012).

Nossos resultados não mostraram diferenças significativas com relação à expressão de PPAR- γ por células epiteliais infectadas e ao controle não estimulado, e também não obtivemos diferenças significativas com relação à células infectadas com a linhagem selvagem (*Kp* 34) e àquelas infectadas pelos mutantes (Figura 16).

Screening inicial dos possíveis genes relacionados ao fenótipo de hiper mucoviscosidade

Após realização de AP-PCRs seguidas de sequenciamento, nós obtivemos um *screening* inicial de proteínas relacionadas a possíveis genes interrompidos durante a mutagênese, que podem estar relacionados com o fenótipo hmv (Tabela 6). A ideia da técnica AP-PCR é utilizar primers arbitrários pareados à primers específicos para o transposon. Com isso, o primer arbitrário vai se ligar à diferentes sítios do genoma, inclusive à regiões próximas ao local de inserção do transposon (que é a região de interesse). Então, os amplicons de interesse serão produzidos a partir de primers arbitrários ligados à regiões próximas ao transposon em conjunto com primers específicos (DAS *et al.*, 2005).

O ferro é muito importante para que a bactéria consiga sobreviver e se multiplicar no interior do hospedeiro (PACZOSA; MECSAS, 2016). *K. pneumoniae* expressa sideróforos e os secreta utilizando sistemas de efluxo como transportadores ABC ou sistemas de efluxo RND para que ferro seja capturado no organismo do hospedeiro. Em seguida, estas moléculas precisam retornar para a bactéria para que ferro seja utilizado por esta. Isso acontece através da interação com receptores específicos na membrana externa, interação com proteínas ligantes presentes no periplasma e transporte para o citoplasma através de uma bomba que pode transportar o sideróforo junto com ferro ou apenas ferro, reciclando o sideróforo (WILSON *et al.*, 2016). Então os possíveis genes interrompidos em M14 como os relacionados com proteína ligadora de ferricromo, transportador ABC de captação de quelante de ferro, ferricromo permease de transportador ABC, ferro permease de transportador

ABC, sistemas de transporte ABC e sistemas de efluxo RND estão relacionados com o transporte de sideróforos nesta linhagem. Apesar desses genes terem possivelmente sido interrompidos, esta linhagem manteve sua capacidade em sobreviver e se multiplicar em sangue e soro humanos, além de também crescer em células epiteliais. Isso pode ser explicado pois *K. pneumoniae* expressa diversos tipos de sideróforos e transportadores, o que garante sua sobrevivência e multiplicação mesmo com a interrupção de um ou outro gene relacionado à estes quelantes de ferro (SHON; BAJWA; RUSSO, 2013).

Transportadores ABC requerem energia para realizar o transporte de moléculas, esta é normalmente obtida através de hidrólise de ATP. Portanto, estes transportadores costumam possuir componentes capazes de se ligar à ATP e facilitar a hidrólise. Estes transportadores podem funcionar como exportadores ou como importadores, que em bactérias Gram-negativas possuem componentes capazes de se ligar à proteínas do periplasma que interagem com o substrato e o apresentam para sistemas de importação presentes na membrana interna (FATH; KOLTER, 1993). Como o fenótipo de hiper mucoviscosidade pode ocorrer devido a superexpressão de polissacarídeos capsulares e estes precisam ser transportados para a superfície da bactéria para que ocorra a formação da cápsula, uma interrupção em transportadores ABC poderia explicar a perda deste fenótipo nas linhagens M14, M48, M68 e M84. Já que estes transportadores são importantes para a exportação de polissacarídeos capsulares em diversas bactérias (SILVER et al., 2001) (WILLIS; WHITFIELD, 2013). Além disso, genes relacionados com proteínas ligadoras de ATP também foram encontrados em alguns dos mutantes, estas proteínas podem estar relacionadas aos transportadores ABC, sendo os componentes responsáveis pela ligação e hidrólise de moléculas ATP para fornecer energia ao transporte. Transportadores ABC também são responsáveis por transportar antígenos O que compõem lipopolissacarídeos de bactérias Gram-negativas como *K. pneumoniae* (KOS; CUTHBERTSON; WHITFIELD, 2009). Fang *et al.* (2004) demonstraram que mutantes que perderam a capacidade de expressar o fenótipo de hiper mucoviscosidade tiveram genes relacionados à síntese de lipopolissacarídeos interrompida (*wb cluster*).

Sistemas de efluxo RND são importantes para conferir resistência à antibióticos, um exemplo destas bombas é AcraB presente em *K. pneumoniae*. Além disso, estes sistemas contribuem para a virulência da bactéria pois também podem secretar adesinas, toxinas e outros fatores importantes para colonização e infecção de células humanas e animais (PIDDOCK *et al.*, 2006). Genes relacionados à este sistema de efluxo podem ter sido interrompidos durante a mutagênese de M14 e afetado sua capacidade em expressar o fenótipo de hiper mucoviscosidade, apesar disso não ter impactado na virulência deste mutante.

L-Fucose isomerase é uma enzima que catalisa a reação entre L-Fucose e L-Fuculose. L-Fucose é um sacarídeo que está presente na cápsula de algumas linhagens de *K. pneumoniae*, principalmente naquelas causadoras de abscessos hepáticos, mas que não é muito encontrada em linhagens que causam infecções no trato urinário (WU *et al.*, 2008). Estudos feitos por Wu *et al.* (2008) mostraram que este açúcar é importante para que a bactéria consiga evadir o sistema imune do hospedeiro, pois linhagens que não possuíam fucose em suas cápsulas interagiram com macrófagos e foram fagocitadas. Além disso, Pan *et al.* (2011) demonstraram que a interrupção de um gene (*gmd*) relacionado à síntese de fucose levou à redução da virulência da bactéria em células HepG2, aumento da produção de biofilme e maior interação com macrófagos. O gene relacionado com L-Fucose isomerase foi possivelmente interrompido nos mutantes M14, M48, M84 e M93. Porém, nenhum destes demonstrou aumento na produção de biofilme ou redução da virulência. Como L-Fucose pode ser um componente capsular desta linhagem de *K. pneumoniae*, a interrupção de um gene relacionado à síntese deste sacarídeo pode ter afetado a capacidade dos mutantes em expressar o fenótipo de hiper mucoviscosidade, apesar de não ter impactado na formação da cápsula.

Transposases são enzimas responsáveis por se ligarem ao final do transposon para catalisar seu transporte para outra região do genoma. Já elementos móveis podem se mover para diferentes sítios do genoma ou ainda, podem ser transferidos para outro microrganismo, como transposons e plasmídeos. O sequenciamento nos mostrou transposases que tiveram seus genes possivelmente interrompidos em M67, M68 e M84.

Sistema de secreção do tipo II é importante para que bactérias secretem proteínas, sendo relevante para sua virulência. Este medeia processos relacionados à formação de biofilme, além de supressão da resposta imune inata, adesão à superfícies, invasão e sobrevivência em células do hospedeiro, dentre outros (CIANCIOTTO; WHITE, 2017). Genes relacionados à este sistema de secreção podem ter sido interrompidos em M84, apesar disso, este mutante manteve sua capacidade de invadir células epiteliais, sua citotoxicidade e também sua capacidade em sobreviver em sangue e soro humanos. Mas houve uma redução da produção de biofilme quando comparado à linhagem selvagem. Como *K. pneumoniae* possui outros sistemas de secreção como do tipo IV e do tipo VI, provavelmente a interrupção do gene relacionado à este sistema de secreção específico não tenha resultado em grande impacto à virulência desta linhagem (LIU *et al.*, 2017) (WANG *et al.*, 2018). Mas este pode ter relação com a perda do fenótipo hiper mucoviscoso. Como M84 também teve genes relacionados à transportadores ABC possivelmente interrompidos, estes também podem ter impactado na capacidade de expressão da hiper mucoviscosidade.

VII. Conclusões

Em conjunto, os dados obtidos demonstram que:

- M67 apresenta maior taxa de multiplicação *in vitro* quando comparado à *Kp* 34 e os demais mutantes;
- Todos os mutantes mantiveram suas cápsulas após a mutagênese;
- A capacidade de produção de biofilme foi reduzida em 62,5% dos mutantes, o que indica que o fenótipo de hiper mucoviscosidade pode ser importante para a formação de biofilme;
- A perda do fenótipo de hiper mucoviscosidade conferiu aos mutantes menor capacidade de multiplicação em sangue humano, o que indica que este fenótipo pode ter relevância em infecções como bacteremias ou infecções sistêmicas. Mas este não gerou grandes impactos na sobrevivência em soro humano.
- M67 apresentou maior sobrevivência no interior de células epiteliais HEp-2 quando comparado à *Kp* 34. Além disso, os mutantes apresentaram maior citotoxicidade para as células, do que *Kp* 34. O que nos mostra que a hiper mucoviscosidade não aparenta ser crucial na interação entre essa linhagem e células epiteliais.
- O fenótipo de hiper mucoviscosidade afeta a capacidade da linhagem em induzir a produção de moléculas com ação microbicida como NO, já que *Kp* 34 induziu maior produção de NO por células epiteliais do que o mutante M67.
- A linhagem apresenta certa resistência aos efeitos de NO e esta não foi afetada com a perda da hiper mucoviscosidade, já que *Kp* 34 e todos os mutantes foram capazes de crescer na presença dessa molécula.
- Genes relacionados ao transporte de sideróforos e de ferro, transportadores ABC, sistemas de efluxo, proteínas ligadoras de ATP, transposases, sistema de secreção do tipo II e L-Fucose isomerase podem ter sido interrompidos durante a mutagênese, afetando assim a expressão do fenótipo de hiper mucoviscosidade.

VIII. Referências Bibliográficas

Abdullah, Z., Geiger, S., Nino-Castro, A., Böttcher, J. P., Muraliv, E., Gaidt, M., ... Klotz, L. (2012). Lack of PPAR γ in myeloid cells confers resistance to *Listeria monocytogenes* infection. **PLoS ONE**, 7(5), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037349>

Abraham, E. P., & Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, 146, 837.

Afroza, S. (2006). Neonatal sepsis - a global problem: an overview. **Mymensingh Med J**, 15(1), 108–114.

Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. **Cell**, 128(6), 1037–1050. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>.

Allen, B. L., Gerlach, G. F., & Clegg, S. (1991). Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, 173(2), 916–920. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.916-920.1991>.

Almeida, P. E., Carneiro, A. B., Silva, A. R., & Bozza, P. T. (2012). PPAR γ expression and function in mycobacterial infection: Roles in lipid metabolism, immunity, and bacterial killing. **PPAR Research**, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/383829>

Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, 289, 321–331. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(94\)00453-6](https://doi.org/10.1016/0009-2614(94)00453-6).

Aronoff, D. M., Serezani, C. H., Carstens, J. K., Marshall, T., Gangireddy, S. R., Peters-Golden, M., & Reddy, R. C. (2007). Stimulatory effects of peroxisome proliferator-activated receptor- γ on Fc γ receptor-mediated phagocytosis by alveolar macrophages. **PPAR Research**, 2007. <https://doi.org/10.1155/2007/52546>.

Asada, K., Sasaki, S., Suda, T., Chida, K., & Nakamura, H. (2004). Antiinflammatory Roles of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ in Human Alveolar Macrophages. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 169(2), 195–200. <https://doi.org/10.1164/rccm.200207-740OC>.

AZEVEDO, J.L.; COSTA, S. O. P. (1973). Exercícios práticos de genética.

Bachman, M. A., Miller, V. L., & Weiser, J. N. (2009). Mucosal lipocalin 2 has pro-inflammatory and iron-sequestering effects in response to bacterial enterobactin. **PLoS Pathogens**, 5(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000622>.

Bachman, M. A., Oyler, J. E., Burns, S. H., Caza, M., Lépine, F., Dozois, C. M., & Weiser, J. N. (2011). Klebsiella pneumoniae yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. **Infection and Immunity**, 79(8), 3309–3316. <https://doi.org/10.1128/IAI.05114-11>.

Bagley. (1985). Habitat association of Klebsiella species. **Infect Control**, 6(2), 52–58.

Bajpai Trupti, Pandey M, Varma M, B. G. S. (2017). Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M beta-lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. **Avicenna J Med**, 7(1), 12–16.

Beceiro, A., Tomás, M., & Bou, G. (2013). Antimicrobial resistance and virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world? **Clinical Microbiology Reviews**, 26(2), 185–230. <https://doi.org/10.1128/CMR.00059-12>.

Berger, J., & Moller, D. E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. **Annu Rev Med**, 53, 409–435.

Bialek, S., Lavigne, J. P., Chevalier, J., Marcon, E., Leflon-Guibout, V., Davin, A., ... Nicolas-Chanoine, M. H. (2010). Membrane efflux and influx modulate both multidrug resistance and virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a *Caenorhabditis elegans* model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 54(10), 4373–4378. <https://doi.org/10.1128/AAC.01607-09>.

Boddicker, J. D., Anderson, R. A., Jagnow, J., & Clegg, S. (2006). Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. **Infection and Immunity**, 74(8), 4590–4597. <https://doi.org/10.1128/IAI.00129-06>.

Bodles, A. M., Varma, V., Yao-Borengasser, A., Phanavanh, B., Peterson, C. A., McGehee, R. E., ... Kern, P. A. (2006). Pioglitazone induces apoptosis of macrophages in human adipose tissue. **Journal of Lipid Research**, 47(9), 2080–2088. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600235-JLR200>.

Bomberger, J. M., MacEachran, D. P., Coutermarsh, B. A., Ye, S., O'Toole, G. A., & Stanton, B. A. (2009). Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. **PLoS Pathogens**, 5(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000382>

Boyd, A. R., & Orihuela, C. J. (2011). Dysregulated inflammation as a risk factor for pneumonia in the elderly. **Aging and Disease**, 2(6), 487–500.

Bradford, P. (2001). Extended-Spectrum Beta-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. **Clinical Microbiology Reviews**, 14(4), 933–951.

Branger, J., Knapp, S., Weijer, S., Leemans, J. C., Pater, J. M., Speelman, P., ... Van Der Poll, T. (2004). Role of Toll-Like Receptor 4 in Gram-Positive and Gram-Negative Pneumonia in Mice. **Infection and Immunity**, 72(2), 788–794. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.788-794.2004>.

Bulger Jeffrey, MacDonald Ulrike, Olson Ruth, Beanan Janet, R. T. A. (2017). Metabolite Transporter PEG344 Is Required for Full Virulence of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Strain hvKP1 after Pulmonary but Not Subcutaneous Challenge. **Infection and Immunity**, 85(10), 1–14.

Burgner, D., Rockett, K., & Kwiatkowski, D. (1999). Nitric oxide and infectious diseases. **Archives of Disease in Childhood**, 81(2), 185–188. <https://doi.org/10.1136/adc.81.2.185>.

Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 39(6), 1211–1233. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.6.1211>.

Bush, K. (2013). The ABCD's of β -lactamase nomenclature. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 19(4), 549–559. <https://doi.org/10.1007/s10156-013-0640-7>

Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>.

Cannatelli, A., Giani, T., D'Andrea, M. M., Pilato, V. Di, Arena, F., Conte, V., ... Rossolini, G. M. (2014). MgrB inactivation is a common mechanism of colistin

resistance in KPC-producing klebsiella pneumoniae of clinical origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 58(10), 5696–5703. <https://doi.org/10.1128/AAC.03110-14>.

Cano, V., Moranta, D., Llobet-Brossa, E., Bengoechea, J. A., & Garmendia, J. (2009). Klebsiella pneumoniae triggers a cytotoxic effect on airway epithelial cells. **BMC Microbiology**, 9, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-156>

Catalán-Nájera, J. C., Garza-Ramos, U., & Barrios-Camacho, H. (2017). Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary Klebsiella spp. phenotypes? **Virulence**, 8(7), 1111–1123. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1317412>.

CDC. (2014). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2007.05.006>.

Chan Yvonne R, Liu Jessica S, Pociask Derek A, Zheng Mingquan, Mietzner Timothy A, Berger Thorsten, Mak Tak W, Clifton Matthew C, Strong Roland K, Ray Prabir, K. J. K. (2009). Lipocalin 2 Is Required for Pulmonary Host Defense against Klebsiella **Infection. J Immunol**, 182(8), 4947–4956.

Chen, J. H., Siu, L. K., Fung, C. P., Lin, J. C., Yeh, K. M., Chen, T. L., ... Chang, F. Y. (2010). Contribution of outer membrane protein K36 to antimicrobial resistance and virulence in Klebsiella pneumoniae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 65(5), 986–990. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq056>.

Chen, N., Ou, H. Y., Van Aartsen, J. J., Jiang, X., Li, M., Yang, Z., ... Lu, Y. (2010). The pheV phenylalanine tRNA gene in klebsiella pneumoniae clinical isolates is an integration hotspot for possible niche-adaptation genomic islands. **Current Microbiology**, 60(3), 210–216. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9526-4>.

Chen, Y. T., Chang, H. Y., Lai, Y. C., Pan, C. C., Tsai, S. F., & Peng, H. L. (2004). Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. **Gene**, 337(1–2), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.05.008>

Cheng, D. L., Liu, Y. C., Yen, M. Y., Liu, Y. C., & Wang, R. S. (1991). Septic Metastatic Lesions of Pyogenic Liver Abscess: Their Association With *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia in Diabetic Patients. **Archives of Internal Medicine**, 151(8), 1557–1559. <https://doi.org/10.1001/archinte.1991.00400080059010>.

Cheng, H. Y., Chen, Y. S., Wu, C. Y., Chang, H. Y., Lai, Y. C., & Peng, H. L. (2010). RmpA regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43. **Journal of Bacteriology**, 192(12), 3144–3158. <https://doi.org/10.1128/JB.00031-10>.

Chou, H. C., Lee, C. Z., Ma, L. C., Fang, C. T., Chang, S. C., & Wang, J. T. (2004). Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. **Infection and Immunity**, 72(7), 3783–3792. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.3783-3792.2004>.

Cianciotto, N. P., & White, R. C. (2017). Expanding role of type II secretion in bacterial pathogenesis and beyond. **Infection and Immunity**, 85(5), 11–16. <https://doi.org/10.1128/IAI.00014-17>

Clements, A., Tull, D., Jenney, A. W., Farn, J. L., Bishop, R. E., Mcphee, J. B., ... Malcolm, J. (2007). Secondary Acylation of *Klebsiella pneumoniae* Lipopolysaccharide Contributes to Sensitivity to Antibacterial Peptides. **J Biol Chem**, 282(21), 15569–15577. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701454200>

Compain, F., Babosan, A., Brisse, S., Genel, N., Audo, J., Ailloud, F., ... Decré, D. (2014). Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, 52(12), 4377–4380. <https://doi.org/10.1128/JCM.02316-14>.

Cortés, G., Borrell, N., De Astorza, B., Gómez, C., Sauleda, J., & Albertí, S. (2002). 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**, 70(5), 2583–2590. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2583-2590.2002>.

Cubero, M., Grau, I., Tubau, F., Pallarés, R., Dominguez, M. A., Liñares, J., & Ardanuy, C. (2015). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007-2013). **Clinical Microbiology and Infection**, 22(2), 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.09.025>.

Das, D. K., & Nester, E. W. (2014). TnpA and Its Use in Transposon Mutagenesis. **Advances in Microbiology**, 4(January), 15–19.

Das, S., Noe, J. C., Paik, S., & Kitten, T. (2005). An improved arbitrary primed PCR method for rapid characterization of transposon insertion sites. **Journal of Microbiological Methods**, 63(1), 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.02.011>.

Datta N, K. P. (1965). Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. **Nature**, 208(5007), 239–241.

de Campos, T. A., Gonçalves, L. F., Magalhães, K. G., Martins, V. de P., Júnior, G. J. P., Peirano, G., ... Pitondo-Silva, A. (2018). A fatal bacteremia caused by

hypermucousviscous KPC-2 producing extensively drug-resistant K64-ST11 *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Frontiers in Medicine**, 5(SEP), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00265>.

DeLeo, F. R., Kobayashi, S. D., Porter, A. R., Freedman, B., Dorward, D. W., Chen, L., & Kreiswirth, B. N. (2017). Survival of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 in human blood. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 61(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.02533-16>.

Diago-Navarro Elizabeth, Calatayud-Baselga Isabel, Sun Donglei, Khairallah Camille, Mann Inderjit, Ulacia-Hernando Amaia, Sheridan Crian, Shi Meiqing, F. B. C. (2017). Antibody-Based Immunotherapy To Treat and Prevent Infection with Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Clinical and Vaccine Immunology**, 24(1).

Domenico, P., Tomas, J. M., Merino, S., Rubires, X., & Cunha, B. A. (1999). Surface antigen exposure by bismuth dimercaprol suppression of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide. **Infection and Immunity**, 67(2), 664–669.

Dong, N., Yang, X., Zhang, R., Chan, E. W. C., & Chen, S. (2018). Tracking microevolution events among ST11 carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* outbreak strains. **Emerging Microbes and Infections**, 7(1), 4–11. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0146-6>.

Doumith, M., Ellington, M. J., Livermore, D. M., & Woodford, N. (2009). Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 63(4), 659–667. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp029>.

Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J., & Poole, K. (1998). Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, 180(20), 5443–5447.

Evrard, B., Balestrino, D., Dosgilbert, A., Bouya-Gachancard, J. L. J., Charbonnel, N., Forestier, C., & Tridon, A. (2010). Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, 78(1), 210–219. <https://doi.org/10.1128/IAI.00864-09>.

Fang, C.-T., Lai, S.-Y., Yi, W.-C., Hsueh, P.-R., Liu, K.-L., & Chang, S.-C. (2007). *Klebsiella pneumoniae* Genotype K1: An Emerging Pathogen That Causes Septic Ocular or Central Nervous System Complications from Pyogenic Liver Abscess. **Clinical Infectious Diseases**, 45(3), 284–293. <https://doi.org/10.1086/519262>.

Fang, C. T., Chuang, Y. P., Shun, C. T., Chang, S. C., & Wang, J. T. (2004). A Novel Virulence Gene in *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications. **Journal of Experimental Medicine**, 199(5), 697–705. <https://doi.org/10.1084/jem.20030857>.

Fang, C., Lai, S., Yi, W., Hsueh, P., & Liu, K. (2010). The Function of *wzy*_ K1 (*magA*), the Serotype K1 Polymerase Gene in *Klebsiella pneumoniae* *cps* Gene Cluster. **The Journal of Infectious Diseases**, 201(8), 1268–1269. <https://doi.org/10.1086/652183>.

Fath, M. J., & Kolter, R. (1993). ABC transporters: Bacterial exporters. **Microbiological Reviews**, 57(4), 995–1017.

Favre-bonte, S., Joly, B., & Forestier, C. (1999). Consequences of Reduction of *Klebsiella pneumoniae* Capsule Expression on Interactions of This Bacterium with Epithelial Cells. **Infection and Immunity**, 67(2), 554–561.

Feng, Y., Lu, Y., & Yao, Z. (2018). Carbapenem-Resistant Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* of Sequence Type 36. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 62(7).

Filgona, J., Banerjee, T., & Anupurba, S. (2015). Role of efflux pumps inhibitor in decreasing antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in North India. **Journal of Infection in Developing Countries**, 9(8), 815–820. <https://doi.org/10.3855/jidc.6216>.

Fischbach, M. A., Lin, H., Liu, D. R., & Walsh, C. T. (2005). In vitro characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 102(3), 571–576. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408463102>.

Fischbach, M. A., Lin, H., Zhou, L., Yu, Y., Abergel, R. J., Liu, D. R., ... Smith, K. D. (2006). The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 103(44), 16502–16507. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604636103>.

Fung, C. P., Lin, Y. T., Lin, J. C., Chen, T. L., Yeh, K. M., Chang, F. Y., ... Siu, L. K. (2012). *Klebsiella pneumoniae* in gastrointestinal tract and pyogenic liver abscess. **Emerging Infectious Diseases**, 18(8), 1322–1325. <https://doi.org/10.3201/eid1808.111053>

Gu, D., Dong, N., Zheng, Z., Lin, D., Huang, M., Wang, L., ... Chen, S. (2018). A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in

a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, 18(1), 37–46. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30489-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30489-9).

Hacker, J., & Carniel, E. (2001). Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity: A Darwinian view of the evolution of microbes. **EMBO Reports**, 2(5), 376–381. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve097>.

Hansen, D. S., Mestre, F., Albertí, S., Hernández-Allés, S., Álvarez, D., Doménech-Sánchez, A., ... Benedí, V. J. (1999). Klebsiella pneumoniae lipopolysaccharide O typing: Revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. **Journal of Clinical Microbiology**, 37(1), 56–62.

Haverkorn, M. L., & Michel, M. F. (1979). Nosocomial klebsiellas: I. Colonization of hospitalized patients. **Journal of Hygiene**, 82(2), 177–193. <https://doi.org/10.1017/S0022172400025602>.

Helen Y Lau, Steven Clegg, T. A. M. (2007). Identification of Klebsiella Pneumoniae Genes Uniquely Expressed in a Strain Virulent Using a Murine Model of Bacterial Pneumonia. **Microb. Pathog.**, 42(4), 148–155. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.

Hodgson, K., Morris, J., Bridson, T., Govan, B., Rush, C., & Ketheesan, N. (2014). Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections. **Immunology**, 144(2), 171–185. <https://doi.org/10.1111/imm.12394>.

Holt, K. E., Wertheim, H., Zadoks, R. N., Baker, S., Whitehouse, C. A., Dance, D., ... Thomson, N. R. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in Klebsiella pneumoniae, an urgent threat to public health. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United**

States of America, 112(27), E3574–E3581. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501049112>.

Hornick, D. B., Allen, B. L., Horn, M. A., & Clegg, S. (1992). Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. **Infection and Immunity**, 60(4), 1577–1588.

Hsieh, P. F., Liu, J. Y., Pan, Y. J., Wu, M. C., Lin, T. L., Huang, Y. Te, & Wang, J. T. (2013). *Klebsiella pneumoniae* peptidoglycan-associated lipoprotein and murein lipoprotein contribute to serum resistance, antiphagocytosis, and proinflammatory cytokine stimulation. **Journal of Infectious Diseases**, 208(10), 1580–1589. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit384>.

Hsieh, P., Lin, T., Lee, C., Tsai, S., & Wang, J. (2008). Serum-Induced Iron-Acquisition Systems and TonB Contribute to Virulence in *Klebsiella pneumoniae* Causing Primary Pyogenic Liver Abscess. **Journal of Infectious Diseases**, 197(12), 1717–1727. <https://doi.org/10.1086/588383>.

Hsu, C. R., Chang, I. W., Hsieh, P. F., Lin, T. L., Liu, P. Y., Huang, C. H., ... Wang, J. T. (2019). A novel role for the *Klebsiella pneumoniae* sap (sensitivity to antimicrobial peptides) transporter in intestinal cell interactions, innate immune responses, liver abscess, and virulence. **Journal of Infectious Diseases**, 219(8), 1294–1306. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy615>.

Huang, Y. H., Chou, S. H., Liang, S. W., Ni, C. E., Lin, Y. T., Huang, Y. W., & Yang, T. C. (2018). Emergence of an XDR and carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain in Taiwan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 73(8), 2039–2046. <https://doi.org/10.1093/jac/dky164>.

J J Bullen, Henry J Rogers, E. G. (1972). Iron binding proteins and. **British Journal of Haematology**, 23, 389.

Jacoby, G. A., & Sutton, L. (1991). Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 35(1), 164–169. <https://doi.org/10.1128/AAC.35.1.164>.

Janani, C., & Ranjitha Kumari, B. D. (2015). PPAR gamma gene - A review. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, 9(1), 46–50. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2014.09.015>.

Jang, S., Wheeler, L., Carey, R. B., Jensen, B., Crandall, C. M., Schrader, K. N., ... Gulland, F. M. D. (2010). Pleuritis and suppurative pneumonia associated with a hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* in California sea lions (*Zalophus californianus*). **Veterinary Microbiology**, 141(1–2), 174–177. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.032>.

Jarvis WR, Munn VP, Highsmith AK, Culver DH, H. J. (1985). The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control*, 6(2), 68–74.

Jerke, K. H., Lee, M. J., & Humphries, R. M. (2016). Polymyxin Susceptibility Testing: A Cold Case Reopened. **Clinical Microbiology Newsletter**, 38(9), 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2016.04.003>.

Johnson Christopher M, G. A. D. (2015). Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annu Rev Genet*, 49, 577–601.

Johnson, R., Mylona, E., & Frankel, G. (2018). Typhoidal *Salmonella*: Distinctive virulence factors and pathogenesis. **Cellular Microbiology**, 20(9). <https://doi.org/10.1111/cmi.12939>.

June, H. W., Wu, A. M., Cheng, G. T., Chang, X. Y., Tsai, S. F., & Wu, T. S. (2008). Contribution of fucose-containing capsules in *Klebsiella pneumoniae* to bacterial virulence in mice. **Experimental Biology and Medicine**, 233(1), 64–70. <https://doi.org/10.3181/0706-RM-170>.

Jung, S. W., Chae, H. J., Park, Y. J., Yu, J. K., Kim, S. Y., Lee, H. K., ... Park, Y. G. (2013). Microbiological and clinical characteristics of bacteraemia caused by the hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* in Korea. **Epidemiology and Infection**, 141(2), 334–340. <https://doi.org/10.1017/S0950268812000933>.

Kabha, K., Schmegner, J., Keisari, Y., Parolis, H., Schlepper-Schaefer, J., & Ofek, I. (1997). SP-A enhances phagocytosis of *Klebsiella* by interaction with capsular polysaccharides and alveolar macrophages. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, 272(2 16-2), 344–352. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1997.272.2.1344>.

Kaczmarek, F. M., Dib-Hajj, F., Shang, W., & Gootz, T. D. (2006). High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of blaACT-1 β -lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin PhoE. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 50(10), 3396–3406. <https://doi.org/10.1128/AAC.00285-06>.

Kelly, D., Campbell, J. I., King, T. P., Grant, G., Jansson, E. A., Coutts, A. G. P., ... Conway, S. (2004). Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA. **Nature Immunology**, 5(1), 104–112. <https://doi.org/10.1038/ni1018>

Kesty, N. C., Mason, K. M., Reedy, M., Miller, S. E., & Kuehn, M. J. (2004). Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. **EMBO Journal**, 23(23), 4538–4549. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600471>

King Dana E, Malone Robb, L. S. H. (2000). New classification and update on the quinolone antibiotics. *Am Fam Physician*, 61(9), 2741–2748.

Kline, K. A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. **Cell Host and Microbe**, 5(6), 580–592. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.011>.

Kloss, E. W., & S, M. M. (1975). Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. **Applied Microbiology**, 30(3), 381–385.

Ko, W. C., Paterson, D. L., Sagnimeni, A. J., Hansen, D. S., Von Gottberg, A., Mohapatra, S., ... Yu, V. L. (2002). Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: Global differences in clinical patterns. **Emerging Infectious Diseases**, 8(2), 160–166. <https://doi.org/10.3201/eid0802.010025>.

Kong, Q., Beanan, J. M., Olson, R., Mac, U. D., Shon, A. S., Metzger, D. J., ... Russo, T. A. (2012). Biofilm formed by a hypervirulent (hypermucoviscous) variant of *Klebsiella pneumoniae* does not enhance serum resistance or survival in an in vivo abscess model. **Virulence**, 3(3), 12. <https://doi.org/10.4161/viru.20383>

Kos, V., Cuthbertson, L., & Whitfield, C. (2009). The *Klebsiella pneumoniae* O2a antigen defines a second mechanism for O antigen ATP-binding cassette transporters. **Journal of Biological Chemistry**, 284(5), 2947–2956. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807213200>

Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., ... Woodford, N. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: A molecular, biological, and epidemiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, 10(9), 597–602. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70143-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70143-2).

Lagos, R., Baeza, M., Corsini, G., Hetz, C., Strahsburger, E., Castillo, J. A., ... Monasterio, O. (2001). Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. **Molecular Microbiology**, 42(1), 229–243. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02630>.

Lagos, R., Wilkens, M., Vergara, C., Cecchi, X., & Monasterio, O. (1993). Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. **FEBS Letters**, 321(2–3), 145–148. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80096-D](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80096-D).

Lai, Y., Peng, H., & Chang, H. (2003). RmpA2, an Activator of Capsule Biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43, Regulates K2 cps Gene Expression at the Transcriptional Level. **Journal of Bacteriology**, 185(3), 788–800. <https://doi.org/10.1128/JB.185.3.788>.

Lam, M. M. C., Wyres, K. L., Duchêne, S., Wick, R. R., Judd, L. M., Gan, Y. H., ... Holt, K. E. (2018). Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination. **Nature Communications**, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05114-7>.

Lawlor, M. S., O'Connor, C., & Miller, V. L. (2007). Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. **Infection and Immunity**, 75(3), 1463–1472. <https://doi.org/10.1128/IAI.00372-06>.

Lee, C. R., Lee, J. H., Park, K. S., Jeon, J. H., Kim, Y. B., Cha, C. J., ... Lee, S. H. (2017). Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 7(NOV). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00483>.

Lee, C. H., Chang, C. C., Liu, J. W., Chen, R. F., & Yang, K. D. (2014). Sialic acid involved in hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* and associated with resistance to neutrophil phagocytosis. **Virulence**, 5(6), 673–679. <https://doi.org/10.4161/viru.32076>.

Lee, I. R., Molton, J. S., Wyres, K. L., Gorrie, C., Wong, J., Hoh, C. H., ... Gan, Y. H. (2016). Differential host susceptibility and bacterial virulence factors driving *Klebsiella* liver abscess in an ethnically diverse population. **Scientific Reports**, 6(June), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep29316>.

Lee, W. S., Choi, S. T., & Kim, K. K. (2011). Splenic abscess: A single institution study and review of the literature. **Yonsei Medical Journal**, 52(2), 288–292. <https://doi.org/10.3349/ymj.2011.52.2.288>.

Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., & Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. **Future Microbiology**, 9(9), 1071–1081. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.48>.

Libby, P., & Plutzky, J. (2007). Inflammation in Diabetes Mellitus: Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Agonists. **American Journal of Cardiology**, 99(4 SUPPL.), 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.11.004>.

Lin, C. T., Chen, Y. C., Jinn, T. R., Wu, C. C., Hong, Y. M., & Wu, W. H. (2013). Role of the cAMP-Dependent Carbon Catabolite Repression in Capsular Polysaccharide Biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS ONE**, 8(2), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054430>.

Lin, T. L., Hsieh, P. F., Huang, Y. T., Lee, W. C., Tsai, Y. T., Su, P. A., ... Wang, J. T. (2014). Isolation of a bacteriophage and its depolymerase specific for K1 capsule of *klebsiella pneumoniae*: Implication in typing and treatment. **Journal of Infectious Diseases**, 210(11), 1734–1744. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu332>.

Lin, Y. T., Liu, C. J., Yeh, Y. C., Chen, T. J., & Fung, C. P. (2013). Ampicillin and amoxicillin use and the risk of *klebsiella pneumoniae* liver abscess in Taiwan. **Journal of Infectious Diseases**, 208(2), 211–217. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit157>.

Liu, L., Ye, M., Li, X., Li, J., Deng, Z., Yu-Feng Yao, & Ou, H. Y. (2017). Identification and characterization of an antibacterial type VI secretion System in the carbapenem-resistant strain *Klebsiella pneumoniae* HS11286. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 7(OCT), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00442>.

Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., ... Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).

Liu, Y. C., Cheng, D. L., & Lin, C. L. (1986). *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess Associated With Septic Endophthalmitis. **Archives of Internal Medicine**, 146(10), 1913–1916. <https://doi.org/10.1001/archinte.1986.00360220057011>.

Llobet, E., March, C., Giménez, P., & Bengoechea, J. A. (2009). Klebsiella pneumoniae OmpA confers resistance to antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 53(1), 298–302. <https://doi.org/10.1128/AAC.00657-08>.

Llobet, E., Martínez-Moliner, V., Moranta, D., Dahlström, K. M., Regueiro, V., Tomás, A., ... Bengoechea, J. A. (2015). Deciphering tissue-induced Klebsiella pneumoniae lipid a structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 112(46), E6369–E6378. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508820112>.

Lorenzo, V. (1984). Isolation and characterization of microcin E492 from Klebsiella pneumoniae. **Arch Microbiol**, 139(1), 72–75.

Lu, M. C., Chen, Y. T., Chiang, M. K., Wang, Y. C., Hsiao, P. Y., Huang, Y. J., ... Lai, Y. C. (2017). Colibactin contributes to the hypervirulence of pks+ K1 CC23 Klebsiella pneumoniae in mouse meningitis infections. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 7(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00103>.

Ma, L., Fang, C., Lee, C., Shun, C., & Wang, J. (2005). Genomic Heterogeneity in Klebsiella pneumoniae Strains Is Associated with Primary Pyogenic Liver Abscess and Metastatic Infection . **The Journal of Infectious Diseases**, 192(1), 117–128. <https://doi.org/10.1086/430619>.

Madigan Michael T, Martinko John M, Bender Kelly S , Buckley Daniel H, S. D. A. (2016). Microbiologia de Brock.

Mahajan, S., Dkhar, H. K., Chandra, V., Dave, S., Nanduri, R., Janmeja, A. K., ... Gupta, P. (2012). Mycobacterium tuberculosis Modulates Macrophage Lipid-Sensing Nuclear Receptors PPAR γ and TR4 for Survival. **The Journal of Immunology**, 188(11), 5593–5603. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103038>

Maiti, P., Chatterjee, S., Dey, R., Kundu, A., & Dey, R. (2014). Biofilms on indwelling urologic devices: Microbes and antimicrobial management prospect. **Annals of Medical and Health Sciences Research**, 4(1), 100. <https://doi.org/10.4103/2141-9248.126612>.

Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E., & Abraham, S. N. (1996). Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . **Nature**. <https://doi.org/10.1038/381077a0>.

March, C., Cano, V., Moranta, D., Llobet, E., Pérez-Gutiérrez, C., Tomás, J. M., ... Bengoechea, J. A. (2013). Role of Bacterial Surface Structures on the Interaction of *Klebsiella pneumoniae* with Phagocytes. **PLoS ONE**, 8(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056847>.

Maroncle, N., Balestrino, D., Rich, C., & Forestier, C. (2002). Identification of *Klebsiella pneumoniae* genes involved in intestinal colonization and adhesion using signature-tagged mutagenesis. **Infection and Immunity**, 70(8), 4729–4734. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4729-4734.2002>

Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 8(JAN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>.

Martin, R. M., Cao, J., Brisse, S., Passet, V., Wu, W., Zhao, L., ... Bachman, M. A. (2016). Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **MSphere**, 1(5), 1–12. <https://doi.org/10.1128/msphere.00261-16>.

Martinez, J. L., Sánchez, M. B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., & Alvarez-Ortega, C. (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, 33(2), 430–449. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00157.x>.

Matatov, R., Goldhar, J., Skutelsky, E., Sechter, I., Perry, R., Podschun, R., ... Ofek, I. (1999). Inability of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* to assemble functional type 1 fimbriae on their surface. **FEMS Microbiology Letters**, 179(1), 123–130. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00402-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00402-4)

Matsen, J. M., Spindler, J. A., & Blosser, R. O. (1974). Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. **Journal of Applied Microbiology**, 28(4), 672–678.

Merino, S., Camprubi, S., Alberti, S., Benedi, V. J., & Tomas, J. M. (1992). Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. **Infection and Immunity**, 60(6), 2529–2535.

Miethke, M., & Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 71(3), 413–451. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00012-07>.

Moranta, D., Regueiro, V., March, C., Llobet, E., Margareto, J., Larrate, E., ... Bengoechea, J. A. (2010). *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of β -defensins by airway epithelial cells. **Infection and Immunity**, 78(3), 1135–1146. <https://doi.org/10.1128/IAI.00940-09>.

Nasiri, G., Peymani, A., Farivar, T. N., & Hosseini, P. (2018). Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* collected from Qazvin and Tehran provinces, Iran. *Infection, Genetics and Evolution*, 64, 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.030>.

Nassif, X., Fournier, J. M., Arondel, J., & Sansonetti, P. J. (1989). Mucoïd phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infection and Immunity*, 57(2), 546–552.

Nassif, X., Honoré, N., Vasselon, T., Cole, S. T., & Sansonetti, P. J. (1989). Positive control of colanic acid synthesis in *Escherichia coli* by *rmpA* and *rmpB*, two virulence–plasmid genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 3(10), 1349–1359. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00116.x>.

Nassif, X., & Sansonetti, P. J. (1986). Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infection and Immunity*, 54(3), 603–608.

Ofek, I., Kabha, K., Athamna, A., Frankel, G., Wozniak, D. J., Hasty, D. L., & Ohman, D. E. (1993). Genetic exchange of determinants for capsular polysaccharide biosynthesis between *Klebsiella pneumoniae* strains expressing serotypes K2 and K21a. *Infection and Immunity*, 61(10), 4208–4216.

Ofek, I., Mesika, A., Kalina, M., Keisari, Y., Podschun, R., Sahly, H., ... Crouch, E. (2001). Surfactant protein D enhances phagocytosis and killing of unencapsulated phase variants of *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 69(1), 24–33. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.24-33.2001>.

Osman, K. M., Hassan, H. M., Orabi, A., & Abdelhafez, A. S. T. (2014). Phenotypic, antimicrobial susceptibility profile and virulence factors of *Klebsiella pneumoniae*

isolated from buffalo and cow mastitic milk. **Pathogens and Global Health**, 108(4), 191–199. <https://doi.org/10.1179/2047773214Y.0000000141>.

Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 80(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00078-15>.

Padilla, E., Llobet, E., Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Bengoechea, J. A., & Albertí, S. (2010). *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 54(1), 177–183. <https://doi.org/10.1128/AAC.00715-09>.

Pagès, J. M., James, C. E., & Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, 6(12), 893–903. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1994>.

Pan, P. C., Chen, H. W., Wu, P. K., Wu, Y. Y., Lin, C. H., & Wu, J. H. (2011). Mutation in fucose synthesis gene of *Klebsiella pneumoniae* affects capsule composition and virulence in mice. **Experimental Biology and Medicine**, 236(2), 219–226. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010193>

Pan, Y. J., Lin, T. L., Chen, Y. H., Hsu, C. R., Hsieh, P. F., Wu, M. C., & Wang, J. T. (2013). Capsular types of *Klebsiella pneumoniae* revisited by wzc sequencing. **PLoS ONE**, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080670>.

Pandey Neelanjana, C. M. (2019). Beta Lactam Antibiotics.

Papakonstantinou, I., Angelopoulos, E., Baraboutis, I., Perivolioti, E., Parisi, M., Psaroudaki, Z., ... Routsis, C. (2014). Risk factors for tracheobronchial acquisition of resistant Gram-negative bacterial pathogens in mechanically ventilated ICU patients.

Journal of Chemotherapy, 27(5), 283–289. <https://doi.org/10.1179/1973947814Y.0000000199>.

Patel, P. K., Russo, T. A., & Karchmer, A. W. (2014). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **OFID**.

Pichavant, M., Delneste, Y., Jeannin, P., Fourneau, C., Brichet, A., Tonnel, A.-B., & Gosset, P. (2003). Outer Membrane Protein A from *Klebsiella pneumoniae* Activates Bronchial Epithelial Cells: Implication in Neutrophil Recruitment . **The Journal of Immunology**, 171(12), 6697–6705. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.12.6697>.

Piddock, L. J. V. (2014). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. **Nature**, 4(August), 629–636. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/nrmicro1464.pdf>

Pinpimai, K., Roe, W. D., Biggs, P. J., & Dittmer, K. E. (2018). Draft Whole-Genome Sequences of Seven Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from New Zealand Sea Lions . **Microbiology Resource Announcements**, 7(20), 1–3. <https://doi.org/10.1128/mra.01270-18>.

Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, 11(4), 589–603. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.4.589>.

Pomakova, D. K., Hsiao, C. B., Beanan, J. M., Olson, R., MacDonald, U., Keynan, Y., & Russo, T. A. (2012). 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**, 31(6), 981–989. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1396-6>.

Qu, T. ting, Zhou, J. cang, Jiang, Y., Shi, K. ren, Li, B., Shen, P., ... Yu, Y. S. (2015). Clinical and microbiological characteristics of Klebsiella pneumoniae liver abscess in East China. **BMC Infectious Diseases**, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0899-7>.

Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: The versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, 20(3), 440–458. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>.

Reddy Aravind T, Lakshimi Sowmya P, Kleinhenz Jennifer M, Sutliff Roy L, Hart C Michael, R. R. C. (2012). Endothelial Cell Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Reduces Endotoxemic Pulmonary Inflammation and Injury. **J Immunol**, 189(11), 5411–5420.

Reddy, A. T., Lakshmi, S. P., & Reddy, R. C. (2016). PPAR γ in Bacterial Infections: A Friend or Foe? **PPAR Research**. <https://doi.org/10.1155/2016/7963540>

Reddy, R. C., Narala, V. R., Keshamouni, V. G., Milam, J. E., Newstead, M. W., & Standiford, T. J. (2008). Sepsis-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is mediated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . **Blood**, 112(10), 4250–4258. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-128967>.

Regueiro, V., Moranta, D., Frank, C. G., Larrarte, E., Margareto, J., March, C., ... Bengoechea, J. A. (2011). Klebsiella pneumoniae subverts the activation of inflammatory responses in a NOD1-dependent manner. **Cellular Microbiology**, 13(1), 135–153. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01526.x>.

Rodrigues, C., Novais, Sousa, C., Ramos, H., Coque, T. M., Cantón, R., ... Peixe, L. (2016). Elucidating constraints for differentiation of major human Klebsiella pneumoniae clones using MALDI-TOF MS. **European Journal of Clinical**

Microbiology and Infectious Diseases, 36(2), 379–386. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2812-8>.

Roe, W. D., Rogers, L., Pinpimai, K., Dittmer, K., Marshall, J., & Chilvers, B. L. (2015). Septicaemia and meningitis caused by infection of New Zealand sea lion pups with a hypermucoviscous strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, 176(3–4), 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.01.019>.

Ruppé, É., Woerther, P. L., & Barbier, F. (2015). Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of Intensive Care**, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s13613-015-0061-0>.

Russo, T. A., & Marr, C. M. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Clinical Microbiology Reviews**, 32(3), 1–42.

Russo, T. A., Beanan, J. M., Olson, R., MacDonald, U., & Cope, J. J. (2009). Capsular polysaccharide and the O-specific antigen impede antibody binding: A potential obstacle for the successful development of an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* vaccine. **Vaccine**, 27(3), 388–395. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.10.082>.

Russo, T. A., Olson, R., MacDonald, U., Beanan, J., & Davidson, B. A. (2015). Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* ex vivo and in vivo. **Infection and Immunity**, 83(8), 3325–3333. <https://doi.org/10.1128/IAI.00430-15>.

Russo, T. A., Olson, R., MacDonald, U., Metzger, D., Maltese, L. M., Drake, E. J., & Gulick, A. M. (2014). Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent

(hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, 82(6), 2356–2367. <https://doi.org/10.1128/IAI.01667-13>.

Russo, T. A., Shon, A. S., Beanan, J. M., Olson, R., MacDonald, U., Pomakov, A. O., & Visitacion, M. P. (2011). Hypervirulent *K. pneumoniae* secretes more and more active iron-acquisition molecules than “classical” *k. pneumoniae* thereby enhancing its virulence. **PLoS ONE**, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026734>.

Schembri, M. A., Blom, J., Krogfelt, K. A., & Klemm, P. (2005). Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, 73(8), 4626–4633. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4626>.

Schroll, C., Barken, K. B., Krogfelt, K. A., & Struve, C. (2010). Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. **BMC Microbiology**, 10(179). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-179>.

Schurtz Sebghati, T. A., Korhonen, T. K., Hornick, D. B., & Clegg, S. (1998). Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. **Infection and Immunity**, 66(6), 2887–2894.

Selden R, Lee S, Wang WL, Bennett JV, E. T. (1971). Nosocomial *Klebsiella* Infections: Intestinal Colonization as a Reservoir. **Ann Intern Med**, 74(5), 657–664.

Shah, R. K., Ni, Z. H., Sun, X. Y., Wang, G. Q., & Li, F. (2017). The determination and correlation of various virulence genes, ESBL, serum bactericidal effect and biofilm formation of clinical isolated classical *klebsiella pneumoniae* and hypervirulent *klebsiella pneumoniae* from respiratory tract infected patients. **Polish Journal of Microbiology**, 66(4), 501–508. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.7042>

Shinn, M. B. (1941). Colorimetric Method for Determination of Nitrite. **Industrial and Engineering Chemistry - Analytical Edition**, 13(1), 33–35. <https://doi.org/10.1021/i560089a010>.

Shon, A. S., Bajwa, R. P. S., & Russo, T. A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella Pneumoniae*: A new and dangerous breed. **Virulence**, 4(2), 107–118. <https://doi.org/10.4161/viru.22718>.

Silver, R. P., Prior, K., Nsahlai, C., & Wright, L. F. (2001). ABC transporters and the export of capsular polysaccharides from Gram-negative bacteria. **Research in Microbiology**, 152(3–4), 357–364. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01207-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01207-4)

Soto, E., Dennis, M. M., Beierschmitt, A., Francis, S., Sithole, F., Halliday-Simmons, I., & Palmour, R. (2017). Biofilm formation of hypermucoviscous and non-hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* recovered from clinically affected African green monkey (*Chlorocebus aethiops sabaeus*). **Microbial Pathogenesis**, 107, 198–201. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.034>

Soto, E., Marchi, S., Beierschmitt, A., Kearney, M., Francis, S., Vanness, K., ... Palmour, R. (2016). Interaction of non-human primate complement and antibodies with hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*. **Veterinary Research**, 47(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0325-1>

Srinivasan, V. B., Venkataramaiah, M., Mondal, A., Vaidyanathan, V., Govil, T., & Rajamohan, G. (2012). Functional characterization of a novel outer membrane porin KpnO, regulated by PhoBR two-component system in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. **PLoS ONE**, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041505>.

Stavrum, R., Stavrum, A. K., Valvatne, H., Riley, L. W., Ulvestad, E., Jonassen, I., ... Grewal, H. M. S. (2011). Modulation of transcriptional and inflammatory responses

in murine macrophages by the Mycobacterium tuberculosis Mammalian cell entry (Mce) 1 complex. **PLoS ONE**, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026295>

Stepanović, S., Ćirković, I., Ranin, L., & Švabić-Vlahović, M. (2004). Biofilm formation by Salmonella spp. and Listeria monocytogenes on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, 38(5), 428–432. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x>.

Struve, C., Bojer, M., & Krogfelt, K. A. (2008). Characterization of Klebsiella pneumoniae type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. **Infection and Immunity**, 76(9), 4055–4065. <https://doi.org/10.1128/IAI.00494-08>.

Struve, C., Bojer, M., & Krogfelt, K. A. (2009). 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**, 77(11), 5016–5024. <https://doi.org/10.1128/IAI.00585-09>.

Struve, C., Forestier, C., & Krogfelt, K. A. (2003). Application of a novel multi-screening signature-tagged mutagenesis assay for identification of Klebsiella pneumoniae genes essential in colonization and infection. **Microbiology**, 149(1), 167–176. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25833-0>

Struve, C., & Krogfelt, K. A. (2003). Role of capsule in Klebsiella pneumoniae virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies. **FEMS Microbiology Letters**, 218(1), 149–154. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2003.tb11511.x>

Struve, C., Roe, C. C., Stegger, M., Stahlhut, S. G., Hansen, D. S., Engelthaler, D. M., ... Krogfelt, A. (2015). Mapping the Evolution of Hypervirulent. **MBio**, 6(4), 1–12.

Sun, J., Zhang, X., Broderick, M., Fein, H., Instruments, W. P., & International, S. (2003). Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **Sensors**, 3, 276–284.

Tarkkanen, A. M., Westerlund-Wikström, B., Erkkilä, L., & Korhonen, T. K. (1998). Immunohistological localization of the MrkD adhesin in the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, 66(5), 2356–2361.

Taur, Y., & Pamer, E. G. (2013). The intestinal microbiota and susceptibility to infection in immunocompromised patients. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 26(4), 332–337. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283630dd3>.

Taylor, R. K., & Manoil, C. an. M. (1989). Broad-Host-Range vectors for delivery of TnphA: use in genetic analysis of secreted virulence determinants of *Vibrio cholerae*. **Journal of Bacteriology**, 171(4), 1870–1878.

Thomas A. Russo, Ruth Olson, Chi-Tai Fang, Nicole Stoesser, Mark Miller, Ulrike MacDonald, Alan Hutson, Jason H. Barker, Ricardo M. La Hoz, J. R. J. (2018). Identification of Biomarkers for Differentiation of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Classical *K. pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, 56(9), 1–12.

Tsai, W. C., Strieter, R. M., Zisman, D. A., Wilkowski, J. M., Bucknell, K. A., Chen, G. H., & Standiford, T. J. (1997). Nitric oxide is required for effective innate immunity against *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, 65(5), 1870–1875.

Tsai, Y. K., Fung, C. P., Lin, J. C., Chen, J. H., Chang, F. Y., Chen, T. L., & Siu, L. K. (2011). *Klebsiella pneumoniae* Outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 55(4), 1485–1493. <https://doi.org/10.1128/AAC.01275-10>.

Tu, Y. C., Lu, M. C., Chiang, M. K., Huang, S. P., Peng, H. L., Chang, H. Y., ... Lai, Y. C. (2009). Genetic requirements for *Klebsiella pneumoniae*-induced liver abscess in an oral infection model. **Infection and Immunity**, 77(7), 2657–2671. <https://doi.org/10.1128/IAI.01523-08>.

Turton, J. F., Payne, Z., Coward, A., Hopkins, K. L., Turton, J. A., Doumith, M., & Woodford, N. (2018). Virulence genes in isolates of *Klebsiella pneumoniae* from the UK during 2016, including among carbapenemase gene-positive hypervirulent K1-st23 and ‘non-hypervirulent’ types ST147, ST15 and ST383. **Journal of Medical Microbiology**, 67(1), 118–128. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000653>.

Turton, J. F., Perry, C., Elgohari, S., & Hampton, C. V. (2010). PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. **Journal of Medical Microbiology**, 59(5), 541–547. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.015198-0>.

Twenhafel, N. A., Whitehouse, C. A., Stevens, E. L., Hottel, H. E., Foster, C. D., Gamble, S., ... Steele, K. E. (2008). Multisystemic abscesses in African green monkeys (*Chlorocebus aethiops*) with invasive *Klebsiella pneumoniae* - Identification of the hypermucoviscosity phenotype. **Veterinary Pathology**, 45(2), 226–231. <https://doi.org/10.1354/vp.45-2-226>.

Van der Bij, A. K., & Pitout, J. D. D. (2012). The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 67(9), 2090–2100. <https://doi.org/10.1093/jac/dks214>.

Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, 19(24), 6823–6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>.

Vogels, G. D., & Van Der Drift, C. (1976). Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. **Bacteriological Reviews**, 40(2), 403–468.

Wang Minggu, Sahm Daniel F, Jacoby George A, H. D. C. (2004). Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the qnrA gene in *Enterobacter cloacae* clinical isolates in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48(4), 1295–1299.

Wang-Lin, S. X., Olson, R., Beanan, J. M., MacDonald, U., Balthasar, J. P., & Russo, T. A. (2017). The capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* is an obstacle for therapeutic passive immunization strategies. **Infection and Immunity**, 85(12), 1–12. <https://doi.org/10.1128/IAI.00591-17>.

Wang, L., Shen, D., Wu, H., & Ma, Y. (2017). Resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* to both intracellular and extracellular killing of neutrophils. **PLoS ONE**, 12(3), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173638>.

Wang, L., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Blunder, M., Liu, X., Malainer, C., ... Atanasov, A. G. (2014). Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): A review. **Biochemical Pharmacology**, 92(1), 73–89. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.018>.

Wang, X., Xie, Y., Li, G., Liu, J., Li, X., Tian, L., ... Qu, H. (2018). Whole-Genome-Sequencing characterization of bloodstream infection-causing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* of capsular serotype K2 and ST374. **Virulence**, 9(1), 510–521. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1421894>

Willis, L. M., & Whitfield, C. (2013). Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. **Carbohydrate Research**, 378, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.05.007>

Wilson Briana R, Bogdan Alexander R, Miyazawa Masaki, Hashimoto Kazunori, T. Y. (2016). Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. **Trends Mol Med.**, 22(12), 1077–1090. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.10.005>

Workman Alan D, Carey Ryan M, Kohanski Michael A, Kennedy David W, Palmer James N, Adappa Nithin D, C. N. A. (2017). Relative susceptibility of airway organisms to antimicrobial effects of nitric oxide Alan. **Int Forum Allergy Rhinol**, 7(8), 770–776. <https://doi.org/10.1002/alr.21966>

Wu, C. C., Wang, C. K., Chen, Y. C., Lin, T. H., Jinn, T. R., & Lin, C. T. (2014). IscR regulation of capsular polysaccharide biosynthesis and iron-acquisition systems in *Klebsiella pneumoniae* CG43. **PLoS ONE**, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107812>.

Wu, J. H., Wu, A. M., Cheng, G. T., Chang, X. Y., Tsai, S. F., & Wu, T. S. (2008). Contribution of fucose-containing capsules in *Klebsiella pneumoniae* to bacterial virulence in mice. **Experimental Biology and Medicine**, 233(1), 64–70. <https://doi.org/10.3181/0706-RM-170>

Wu, K. M., Li, N. H., Yan, J. J., Tsao, N., Liao, T. L., Tsai, H. C., ... Tsai, S. F. (2009). Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. **Journal of Bacteriology**, 191(14), 4492–4501. <https://doi.org/10.1128/JB.00315-09>.

Wu, M. C., Lin, T. L., Hsieh, P. F., Yang, H. C., & Wang, J. T. (2011). Isolation of genes involved in biofilm formation of a *klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess. **PLoS ONE**, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023500>.

Wu, M. F., Yang, C. Y., Lin, T. L., Wang, J. T., Yang, F. L., Wu, S. H., ... Hsieh, S. L. (2009). Humoral immunity against capsule polysaccharide protects the host from magA+ *Klebsiella pneumoniae*-induced lethal disease by evading toll-like receptor 4 signaling. **Infection and Immunity**, 77(2), 615–621. <https://doi.org/10.1128/IAI.00931-08>.

Xie, Y., Tian, L., Li, G., Qu, H., Sun, J., Liang, W., ... Ou, H. Y. (2018). Emergence of the third-generation cephalosporin-resistant hypervirulent *klebsiella pneumoniae* due to the acquisition of a self-transferable blaDHA-1-carrying plasmid by an ST23 strain. **Virulence**, 9(1), 838–844. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1456229>.

Xu, M., Li, A., Kong, H., Zhang, W., Chen, H., Fu, Y., & Fu, Y. (2018). Endogenous endophthalmitis caused by a multidrug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain belonging to a novel single locus variant of ST23: First case report in China. **BMC Infectious Diseases**, 18(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3543-5>.

Xue, J., Tan, B., Yang, S., Luo, M., Xia, H., Zhang, X., ... Qiu, J. (2016). Influence of cAMP receptor protein (CRP) on bacterial virulence and transcriptional regulation of allS by CRP in *Klebsiella pneumoniae*. **Gene**, 593(1), 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.08.006>.

Ye, M., Tu, J., Jiang, J., Bi, Y., You, W., Zhang, Y., ... Wang, M. (2016). Clinical and genomic analysis of liver abscess-causing *Klebsiella pneumoniae* identifies new liver abscess-associated virulence genes. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 6(NOV), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00165>.

Yeh, K. M., Kurup, A., Siu, L. K., Koh, Y. L., Fung, C. P., Lin, J. C., ... Koh, T. H. (2007). 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**, 45(2), 466–471. <https://doi.org/10.1128/JCM.01150-06>.

Yeh, K., Lin, J., Yin, F., Fung, C., Hung, H., Siu, L., & Chang, F. (2010). Revisiting the Importance of Virulence Determinant *magA* and Its Surrounding Genes in *Klebsiella pneumoniae* Causing Pyogenic Liver Abscesses: Exact Role in Serotype K1 Capsule Formation. **The Journal of Infectious Diseases**, 201(8), 1259–1267. <https://doi.org/10.1086/606010>.

Yeh, K., Lin, J., Yin, F., Fung, C., Hung, H., Siu, L., & Chang, F. (2010). Revisiting the Importance of Virulence Determinant *magA* and Its Surrounding Genes in *Klebsiella pneumoniae* Causing Pyogenic Liver Abscesses: Exact Role in Serotype K1 Capsule Formation. **The Journal of Infectious Diseases**, 201(8), 1259–1267. <https://doi.org/10.1086/606010>.

Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla* NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 53(12), 5046–5054. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>.

Yoshida, K., Matsumoto, T., Tateda, K., Uchida, K., Tsujimoto, S., & Yamaguchi, K. (2000). Role of bacterial capsule in local and systemic inflammatory responses of mice during pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Medical Microbiology**, 49(11), 1003–1010. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-11-1003>.

Yoshida, K., Matsumoto, T., Tateda, K., Uchida, K., Tsujimoto, S., & Yamaguchi, K. (2001). Induction of interleukin-10 and down-regulation of cytokine production by *Klebsiella pneumoniae* capsule in mice with pulmonary infection. **Journal of Medical Microbiology**, 50(5), 456–461. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-5-456>.

Yu Fangyou, Lv Jingnan, Niu Siqiang, Tang Yi-Wei, Pitout Johann D D, Bonomo Robert A, Kreiswirth Barry N, C. L. (2018). Multiplex PCR Analysis for Rapid Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenem-Resistant (Sequence Type 258 [ST258] and ST11) and Hypervirulent (ST23, ST65, ST86, and ST375) Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, 56(9).

Yu, V. L., Hansen, D. S., Wen, C. K., Sagnimeni, A., Klugman, K. P., Von Gottberg, A., ... Mulazimoglu, L. (2007). Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. **Emerging Infectious Diseases**, 13(7), 986–993. <https://doi.org/10.3201/eid1307.070187>.

Yu, W.-L., Ko, W.-C., Cheng, K.-C., Lee, H.-C., Ke, D.-S., Lee, C.-C., ... Chuang, Y.-C. (2006). Association between *rmpA* and *magA* Genes and Clinical Syndromes Caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. **Clinical Infectious Diseases**, 42(10), 1351–1358. <https://doi.org/10.1086/503420>.

Yu, W., Fung, C., Ko, W., Cheng, K., Lee, C., & Chuang, Y. (2007). Polymerase Chain Reaction Analysis for Detecting Capsule Serotypes K1 and K2 of *Klebsiella pneumoniae* Causing Abscesses of the Liver and Other Sites. **The Journal of Infectious Diseases**, 195(8), 1235–1236. <https://doi.org/10.1086/512686>.

Zhang, J., van Aartsen, J. J., Jiang, X., Shao, Y., Tai, C., He, X., ... Ou, H. Y. (2011). Expansion of the known *Klebsiella pneumoniae* species gene pool by characterization of novel alien DNA islands integrated into tmRNA gene sites. **Journal of Microbiological Methods**, 84(2), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.12.016>.

Zhang, R., Ou, H.-Y., Gao, F., & Luo, H. (2014). Identification of Horizontally-transferred Genomic Islands and Genome Segmentation Points by Using the GC Profile Method. **Current Genomics**, 15(2), 113–121. <https://doi.org/10.2174/1389202915999140328163125>.

Zheng, J. X., Lin, Z. W., Chen, C., Chen, Z., Lin, F. J., Wu, Y., ... Deng, Q. wen. (2018). Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of wcaG. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 8(FEB). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00021>

Zolfaghari, P. S., & Wyncoll, D. L. A. (2011). The tracheal tube: Gateway to ventilator-associated pneumonia. **Critical Care**, 15(5). <https://doi.org/10.1186/cc10352>.