



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Barbara Araújo Nogueira

***Klebsiella pneumoniae* multirresistentes: endemicidade, disseminação,  
potencial de virulência e diversidade molecular de cepas de origem  
ambiental e de unidade hospitalar da região metropolitana do Rio de  
Janeiro**

Rio de Janeiro

2021

Barbara Araújo Nogueira

***Klebsiella pneumoniae* multirresistentes: endemicidade, disseminação, potencial de virulência e diversidade molecular de cepas de origem ambiental e de unidade hospitalar da região metropolitana do Rio de Janeiro**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Cláudia Rosa de Paula Ignácio

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

N778 Nogueira, Barbara Araújo.  
*Klebsiella pneumoniae* multirresistentes: endemicidade, disseminação,  
potencial de virulência e diversidade molecular de cepas de origem ambiental e  
de unidade hospitalar da região metropolitana do Rio de Janeiro / Barbara  
Araújo Nogueira – 2021.  
108f.

s

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de  
Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Infecção hospitalar - Teses. 2. *Klebsiella pneumoniae*. 3. Virulência  
(Microbiologia) - Teses. 4. Eletroforese em Gel de Campo Pulsado. I. Guaraldi, Ana  
Luiza de Mattos. II. Ignácio, Ana Cláudia de Paula Rosa. III. Universidade do  
Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616-022.1

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta  
tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Barbara Araújo Nogueira

***Klebsiella pneumoniae* multirresistentes: endemicidade, disseminação, potencial de virulência e diversidade molecular de cepas de origem ambiental e de unidade hospitalar da região metropolitana do Rio de Janeiro**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de maio de 2021.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra Ana Luíza de Mattos Guaraldi (Orientadora)  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Dra. Paula Marcele Afonso Pereira Ribeiro  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Dra. Renata Garcia Costa  
Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr. Claudio Marcos Rocha de Souza  
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2021

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a todos os meus protetores espirituais que permitiram que mais essa etapa da minha vida fosse concluída.

Aos meus pais Marco e Deborah e ao meu irmão Bernardo por todo amor, carinho, dedicação e incentivo. Por nunca permitirem que eu desistisse, por todo o apoio nos momentos de dúvidas e por terem feito o possível e o impossível por mim.

As minhas orientadoras Prof. Dr<sup>a</sup> Ana Luíza e ProfDr<sup>a</sup> Ana Cláudia por todas as conversas, conselhos e incentivos. São excelentes profissionais e me deram a honra de compartilhar seus conhecimentos comigo. Cada reunião foi uma aula que eu levarei para toda a minha vida tanto no campo profissional quanto pessoal.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Raphael Hirata que foi tirado de nós tão precocemente mas que deixou um legado inenarrável. Sua sabedoria, seus conselhos e sua risada serão eternamente lembrados por todos os alunos. Você será sempre o nosso “deus” da sabedoria. Foi uma honra ter crescido e aprendido com você durante todos esses anos. Você viverá sempre em nossos corações.

Aos meus amores laboratoriais: Bruna, Paula, Julianna, Renata e a todos do laboratório 1 e laboratório 3 que me acolheram tão bem e se mostraram sempre dispostos a ajudar. Obrigada pela companhia diária. Obrigada por compartilharem suas famílias, seus momentos especiais e o desejo que ajudar o próximo buscando sempre o nosso melhor. Sem a companhia de vocês esse trabalho não teria a menor graça.

Agradeço também a CAPES pelo auxílio financeiro inestimável a essa pesquisa e ao ProGrama de Pós-Graduação em Microbiologia por acreditarem no meu projeto.

E a todos que, de modo geral, torceram por mim direta ou indiretamente. Meu muito obrigada!

Jamais desista das pessoas que você ama! Lute sempre pelos seus sonhos! Seja profundamente apaixonado pela vida. Decifre os códigos da felicidade. Pois a felicidade sustentável não pertence aos que não se estressam, mas aos que transformam seus invernos em primaveras e aos que fazem da vida um espetáculo único e imperdível.

*Augusto Cury*

## RESUMO

NOGUEIRA, Barbara Araújo. ***Klebsiella pneumoniae* multirresistentes**: endemicidade, disseminação, potencial de virulência e diversidade molecular de cepas de origem ambiental e de unidade hospitalar da região metropolitana do Rio de Janeiro. 2021. 108f. Tese (Doutorado em Microbiologia) –Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

*Klebsiella pneumoniae* tem sido descrita com um dos principais patógenos relacionados com infecções hospitalares e comunitárias devido à crescente mortalidade. A presença de genes de resistência associados a mecanismos de virulência, incluindo a capacidade de formação de biofilme, dificultam o tratamento de infecções. O objetivo do presente estudo foi analisar o perfil de resistência a agentes antimicrobianos, tipificação molecular e os mecanismos de virulência de amostras de *K. pneumoniae* isoladas de infecções nosocomiais e de águas fluviais. As cepas hospitalares foram obtidas através do LABAC enquanto as cepas de ambientes fluviais foram coletadas em quatro pontos distintos dos rios Joana e Maracanã. Os perfis de multirresistência foram determinados por técnica de disco-difusão e submetidas à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de genes que codificam resistência: beta-lactamase de espectro estendido (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* e *bla<sub>TOHO</sub>*); enzimas modificadoras de aminoglicosídeos [*aacc2*, *aacc3* e *aacc(6)-Ib-cr*]; genes plasmidiais mediando resistência a fluorquinolonas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrD*, *qnrS* e *qepA*); carbapenemases (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIME</sub>* e *bla<sub>OXA</sub>*) e virulência: K1, K2, *fimH*, *mrkD* e *KfuBc*. Adicionalmente, cepas MDR de *K. pneumoniae* foram submetidas a ensaios de formação de biofilme em superfícies abióticas diversas, ensaios de mortalidade utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental, pesquisa da capacidade de aderência, viabilidade intracelular e persistência utilizando célula endotelial humana CACO-2, além da tipificação molecular por técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). No total, 45 cepas MDR de *K. pneumoniae* foram analisadas no presente estudo. Foram observadas a presença de genes de resistência em todas as cepas analisadas, exceto três cepas ambientais. Nenhuma das cepas hospitalares apresentou gene de resistência para carbapenemase e 11 cepas ambientais apresentaram genes de resistência de diferentes classes de agentes antimicrobianos concomitantemente. A análise do perfil de virulência demonstrou que todas as cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas no ambiente hospitalar e 21 cepas do ambiente fluvial apresentaram o gene *fimH*. Todas as cepas estudadas apresentaram capacidade de formação de biofilme em diferentes níveis e intensidades. Análises realizadas através do PFGE demonstrou a presença de nove perfis clonais distintos, onde, um dos perfis albergou cepas do ambiente hospitalar e fluvial. A interação bacteriana demonstrou uma heterogeneidade, entretanto nenhuma das cepas foi capaz de matar os nematódeos *Caenorhabditis elegans* após os cinco dias de infecção. Todas as cepas analisadas foram capazes de aderir à superfície da célula CACO-2 em diferentes níveis, independente da concentração bacteriana e do tempo de incubação. Os resultados dos ensaios de viabilidade e persistência intracelular vários de acordo com o tempo de execução e as concentrações bacterianas utilizadas. Foi possível concluir que cepas de *K. pneumoniae* são heterogêneas e apresentam alta capacidade de adaptação. Além disso, quando associadas a diferentes mecanismos de resistência e virulência, apresentam dificuldade no tratamento de infecções, se tornando cada vez mais necessário a busca de novas opções terapêuticas.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*. Multirresistência. Virulência. PFGE. Ambiente fluvial.

## ABSTRACT

NOGUEIRA, Barbara Araújo. **Multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae***: endemicity, dissemination, virulence potential and molecular diversity of strains isolated from environment and hospital located at Rio de Janeiro metropolitan area. 2021. 108f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

*Klebsiella pneumoniae* has been described as one of the main pathogens related to hospital and community acquired infections due to the increasing mortality. The presence of resistance genes associated with virulence mechanisms, including the ability of biofilm formation, delay the infections treatment. The aim of this present study was to analyze the resistance profile to antimicrobial agents, molecular typing and virulence mechanisms of *K. pneumoniae* strains isolated from nosocomial infections and river waters. Hospital strains were obtained through LABAC while river isolates strains were collected from four sites of Joana and Maracanã rivers. Multidrug resistance profiles were determined using the disk-diffusion method and polymerase chain reaction (PCR) assays for detection of genes that encode resistance: extended-spectrum beta-lactamase (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>TOHO</sub>); aminoglycoside-modifying enzymes [*aacc2*, *aacc3* e *aacc(6)-Ib-cr*]; plasmid mediated quinolones resistance (*qnrA*, *qnrB*, *qnrD*, *qnrS* e *qepA*); carbapenemases (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>OXA</sub>) and virulence: K1, K2, *fimH*, *mrkD* and *KfuBc*. Additionally, *K. pneumoniae* MDR strains were subjected to biofilm formation assays on abiotic surfaces, mortality assays using nematode *Caenorhabditis elegans* as experimental model, investigation of adherence capacity, intracellular viability and persistence using human endothelial CACO-2 cell, in addition to molecular typing by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). A total of 45 *K. pneumoniae* MDR strains were analyzed. Resistance genes were observed in all strains, but three environmental isolates. Hospital strains did not presented resistance gene for carbapenemase while 11 environmental strains harbored at least one resistance genes for different antimicrobial agents classes. Virulence profile demonstrated that all *K. pneumoniae* MDR strains isolated from nosocomial environment and 21 strains from river environment presented *fimH* gene. All strains showed biofilm formation capacity at different levels and intensities. PFGE analyzis demonstrated nine different clones, including one pulsotype harbored strains from nosocomial and river environment. Bacterial interaction demonstrated heterogeneity despite none of them ware able to kill *Caenorhabditis elegans* nematodes after five days infection. All strains were able to adhere on CACO-2 cell at different levels, regardless bacterial concentration and incubation time. The results of the intracellular viability and persistence tests diverge according to execution time and bacterial concentrations. In conclusion, *K. pneumoniae* strains are heterogeneous and have a high capacity for adaptation. In addition, when associated with different resistance and virulence mechanisms, they are difficulty to treat infections, being necessary to search for new therapeutic options.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*. Multi-drug resistance. Virulence. PFGE. River waters.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Pontos de coleta das amostras ambientais obtidas nos rios Maracanã e Joana.....	30
Figura 2 – Padrões de aderência na formação de biofilme em tubos de vidro.....	38
Figura 3 – Teste de inibição de beta-lactamase pelo ácido clavulânico e ao teste de aproximação de disco .....	49
Figura 4 – Teste de inibição de beta-lactamase pelo ácido clavulânico e ao teste de aproximação de disco .....	49
Figura 5 – Dendograma demonstrando os diferentes perfis clonais de cepas multirresistentes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> obtidas de casos clínicos e de diferentes pontos dos rios Joana e Maracanã, localizados na região urbana do Rio de Janeiro, Brasil.....	58

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Correlação do número de cepas fluviais de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isoladas em cada ponto de coleta com o agente antimicrobiano adicionado ao meio seletivo.....	44
Gráfico 2 –	Cepas multirresistentes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isoladas de pacientes infectados carregando genes que codificam resistência - ESBLs*, EMA* e PMQR*.....	50
Gráfico 3 –	Cepas multirresistentes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isoladas ambiente fluvial carregando genes que codificam resistência -ESBLs*, EMA*, PMQR* e carbapenêmicos.....	52
Gráfico 4 –	Cepas multirresistentes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isoladas de pacientes infectados carregando genes de virulência relacionados com a capacidade de aderência bacteriana ( <i>fimH</i> ), formação de biofilme ( <i>mrkD</i> ) e captação de ferro ( <i>KfuBC</i> ).....	54
Gráfico 5 –	Cepas multirresistentes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isoladas de quatro pontos dos rios Joana e Maracanã carregando genes de virulência relacionados com a capacidade de aderência bacteriana ( <i>fimH</i> ), formação de biofilme ( <i>mrkD</i> ) e captação de ferro ( <i>KfuBC</i> ).....	54
Gráfico 6 –	Efeitos da inoculação de cepas de MDR de <i>Klebsiella pneumoniae</i> oriundas pacientes infectados e do ambiente fluvial na sobrevivência do nematódeo <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	60
Gráfico 7 –	Inibição de viabilidade de nematódeo <i>Caenorhabditis elegans</i> relacionada com cepas multirresistentes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> expressando diferentes perfis clonais.....	61
Gráfico 8 –	Análise comparativa do tempo de inibição de viabilidade de nematódeo <i>Caenorhabditis elegans</i> causados por cepas multirresistentes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> expressando diferentes perfis clonais.....	62
Gráfico 9 –	Interação de células endoteliais humanas (CACO-2) com cepas multirresistentes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> de diferentes pulsotipos isoladas de pacientes infectados e ambiente fluvial na concentração de MOI10 após 2h e 4h de infecção.....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Desenho dos oligonucleotídeos referentes aos genes de resistência para ESBL, EMA, PMQR e carbapenêmicos demonstrando as ciclagens individuais, os pares de bases e sequências de DNA utilizadas para cada nucleotídeo, com as referências utilizadas.....	35
Tabela 2 –	Desenho dos oligonucleotídeos referentes aos genes de virulência demonstrando as ciclagens individuais, os pares de bases e sequências de DNA utilizadas para cada nucleotídeo, com as referências.....	36
Tabela 3 –	Isolamento e identificação de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> de origem hospitalar durante o ano de 2016.....	43
Tabela 4 –	Cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> expressando perfis de multirresistência isoladas de pacientes do Hospital Universitário Pedro Ernesto-UERJ.....	46
Tabela 5 –	Cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> expressando perfis de multirresistência aos agentes antimicrobianos isoladas dos rios Joana e Maracanã, localizados na região urbana do Rio de Janeiro, Brasil.....	47
Tabela 6 –	Capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica em cepas multirresistentes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isoladas de pacientes infectados.....	55
Tabela 7 –	Capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica em cepas multirresistentes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isoladas de ambiente fluvial.....	55
Tabela 8 –	Perfis genotípicos determinados pela técnica de PFGE de cepas multirresistentes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> obtidas de casos clínicos e de diferentes pontos dos rios Joana e Maracanã, localizados na região urbana do Rio de Janeiro, Brasil.....	59
Tabela 9 –	Desvio padrão do perfil de morte do nematódeo <i>Caenorhabditis elegans</i> após cinco dias de infecção causados por diferentes pulsotipos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	64
Tabela 10 –	Interação de células endoteliais humanas (CACO-2) com cepas multirresistentes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> de diferentes pulsotipos isoladas de pacientes infectados e ambiente fluvial.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB	Ácido fenilburônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	Brain hearth infusion
CDC	US Centers for Disease Control and Prevention
CLOXA	Cloxacilina
CLSI	Clinical&Laboratory Standards Institute
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CTI	Centro de Terapia Intensiva
DIMI	Disciplina de Microbiologia e Imunologia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA	Enzima modificadora de aminoglicosídeo
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido
FCM	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFF	Instituto Fernandes Figueira
IRAS	Infecções relacionadas à assistência a saúde
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LABAC	Laboratório de Bacteriologia
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
MEM	Meio Essencial Mínimo
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MHA	Ágar Muller-Hinton
MOI	Multiplicidade de Infecção
NaCl	Cloreto de sódio
NGM	Nematode growth medium
NT	Não testado
OMS	Organização Mundial da Saúde

PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
PMQR	Plasmid-mediated quinolone resistance
RPM	Rotação por minuto
TE	Tris-EDTA
TBE	Tris/Borato/EDTA
TSA	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos
TSB	Tryptone soy broth
UCI	Unidade de cuidado intensivo
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UTI	Unidade de tratamento intensivo

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\beta$	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
mL	Mililitro
$\text{cm}^2$	Centímetro quadrado
UFC	Unidade formadora de colônia
rpm	Rotações por minuto
$\lambda$	Absorbância
h.	Hora
s.	Segundo
U	Unidade
mM	Milimolar
pmol	Picomol
nM	Nanomolar

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
1.1	<b>Objetivo geral</b> .....	29
1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	29
2	<b>METODOLOGIA</b> .....	30
2.1	<b>Origem das amostras</b> .....	30
2.2	<b>Identificação bacteriana</b> .....	31
2.3	<b>Avaliação da susceptibilidade, heterogeneidade e dos perfis de resistência aos agentes antimicrobianos</b> .....	31
2.4	<b>Ensaio fenotípico de detecção de produção de beta-lactamases e carbapenemases</b> .....	32
2.4.1.	<u>Teste de inibição de beta-lactamase pelo ácido clavulânico</u> .....	32
2.4.2.	<u>Teste de aproximação de disco por difusão em Agar</u> .....	32
2.4.3.	<u>Teste com inibidores e potenciador para detecção de carbapenemase</u> .....	33
2.5	<b>Detecção de genes por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</b> .....	33
2.5.1.	<u>Detecção de genes de resistência em cepas MDR de <i>K. pneumoniae</i></u> .....	33
2.5.2.	<u>Detecção de genes que codificam fatores de virulência diversos de cepas MDR de <i>K. pneumoniae</i></u> .....	36
2.6	<b>Ensaio de formação de biofilme em superfícies abióticas</b> .....	37
2.6.1	<u>Preparo das suspensões bacterianas</u> .....	37
2.6.2	<u>Análise quantitativa de produção de biofilme em superfície hidrofóbica</u> .....	37
2.6.3	<u>Análise quantitativa de produção de biofilme em superfície hidrofílica</u> .....	37
2.7	<b>Ensaio de interação bacteriana com células endoteliais humanas</b> .....	38
2.8	<b>Ensaio de viabilidade de <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de infecção <i>in vivo</i></b> .....	40
2.9	<b>Caracterização genotípica por Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)</b> .....	40
2.9.1	<u>Preparo das amostras</u> .....	40
2.9.2	<u>Digestão das amostras com enzima de restrição</u> .....	41
2.9.3	<u>Preparo do gel e eletroforese</u> .....	41
2.9.4	<u>Análise dos perfis de bandas</u> .....	42
3	<b>RESULTADOS</b> .....	43

3.1	<b>Origem e identificação das amostras.....</b>	43
3.1.1	<u>Cepas isoladas de infecções nosocomiais.....</u>	43
3.1.2	<u>Cepas isoladas de águas fluviais.....</u>	44
3.2	<b>Perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos diversos.....</b>	45
3.3	<b>Expressão de perfis de multirresistência aos agentes antimicrobianos.....</b>	45
3.4	<b>Deteção da possível presença de Beta-lactamase de Espectro Estendido (ESBLs) e carbapenemases.....</b>	49
3.5	<b>Presença de genes que codificam resistência aos agentes antimicrobianos....</b>	49
3.6	<b>Presença de genes que codificam virulência aos agentes antimicrobianos.....</b>	53
3.7	<b>Capacidade de formação de biofilme em superfícies abióticas.....</b>	55
3.8	<b>Perfis genotípicos das cepas MDR de <i>K. pneumoniae</i> determinados pela técnica de PFGE.....</b>	56
3.9	<b><i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de infecção <i>in vivo</i>.....</b>	60
3.10	<b>Interação bacteriana com células endoteliais humanas de linhagem CACO-2.....</b>	63
4	<b>DISCUSSÃO.....</b>	66
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	75
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	77
	<b>ANEXO – Perfil clonal de <i>Klebsiellapneumoniae</i> multirresistente demonstrando os sítios/pontos de isolamento, perfil de resistência, genes de resistência e virulência, além da capacidade de formação de biofilme em superfícies abióticas.....</b>	97
	<b>APÊNDICE A – Artigos publicados.....</b>	99
	<b>APÊNDICE B – Capítulos de livros publicados.....</b>	103
	<b>APÊNDICE C – Artigos submetidos.....</b>	105
	<b>APÊNDICE D – Artigo submetido com resultados complementares a tese.....</b>	108

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, bactérias Gram-negativas têm adquirido um papel importante nas infecções hospitalares, sendo consideradas como um dos principais agentes etiológicos e um problema de Saúde Pública mundial devido à sua prevalência e altos índices de resistência associados à mortalidade. Elas encontram-se comumente associadas aos quatro tipos mais comuns de infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS): pneumonia, infecções de sítio cirúrgico, no trato urinário e na corrente sanguínea. Dentre os principais microrganismos Gram-negativos causadores de infecções, está a família Enterobacteriaceae (ANVISA, 2015; Cabral et al., 2017).

Membros desta família são morfotintorialmente classificados como bastonetes Gram-negativos. São anaeróbios facultativos e, quando capazes de se locomover, fazem-no por meio de flagelos. São microrganismos com necessidades nutricionais simples; fermentam glicose e produzem ácido a partir dessa reação. Diferentemente de outras bactérias Gram-negativas, as Enterobacteriaceae são catalase-positivas e oxidase-negativas. A maioria das enterobactérias é móvel e apresentam flagelos peritríquios, exceto os gêneros *Klebsiella*, *Shigella* e *Yersinia* (Tortora, Funke, Case, 2008).

Apesar de serem encontradas na microbiota do trato gastrointestinal, quando encontradas em amostras biológicas, a família das Enterobactérias pode estar relacionada às IRAS, principalmente infecções intestinais. Além disso, espécies pertencentes a essa família são consideradas ubiqüitárias, podendo ser encontradas em quase todos os ambientes naturais, incluindo água, solo e plantas. A família Enterobacteriaceae engloba espécies intimamente relacionadas, pertencentes a diferentes clados: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Kosakonia*, *Cronobacter* e *Cedecea* (Rossi, 2011; Gales et al., 2012; Alnajjar, Gupta, 2017; Flokas et al., 2017).

A maioria das espécies relacionadas as IRAS são coletivamente denominadas como ESKAPE (*Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*). Infecções relacionadas com esses microrganismos são potencialmente fatais principalmente pelo perfil de multirresistência que essas cepas apresentam. Inclusive, a Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolveu uma lista de prioridade global de organismos, incluindo os grupo ESKAPE, que necessitam de pesquisas, descobertas e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (Rosa-Zamboni et al., 2018). O acrônimo ESKAPE reflete a capacidade desses patógenos de "escapar" da ação de

agentes antimicrobianos e da ação das terapias convencionais, sendo associados a um alto risco de mortalidade e aumento dos custos econômicos na área de saúde. Focar a atenção nesses microorganismos patogênicos é importante, uma vez que alguns estudos demonstraram que pacientes com cepas do grupo ESKAPE apresentando perfil de MDR são mais propensos a receber terapia antibiótica inadequada, resultando em taxas de mortalidade e oportunidades de disseminação para outros pacientes mais elevadas (Karlowsky et al., 2017; Ma et al., 2019).

Um dos principais gêneros relacionados com infecções em humanos e de difícil tratamento em decorrência da expressão de potentes mecanismos de resistência e virulência é o gênero *Klebsiella*. Esse gênero inclui microorganismos capazes de formar cápsula mucoide polissacarídica, que tem como função a proteção contra ação de bactericidas, habilidade de formação de biofilme como fatores de virulência que contribuem para a aderência bacteriana em superfícies bióticas e abióticas favorecendo os processos infecciosos (Oliveira et al., 2011; Choby, Howard-Anderson, Weiss, 2020).

*Klebsiella* spp. são ubiqüitárias, podendo ser encontradas na natureza, incluindo água, solo e animais, além de colonizar dispositivos médicos e o ambiente de saúde. As espécies de *Klebsiella* são consideradas patógenos oportunistas uma vez que colonizam superfícies mucosas sem causar danos aos indivíduos sadios. Entretanto, *Klebsiella* spp. podem disseminar para outros tecidos a partir de superfícies mucosas, principalmente de pacientes imunocomprometidos e causar infecções, incluindo pneumonia, infecções no trato urinário, na corrente sanguínea e sepse (Oliveira et al., 2011; Paczosa, Meccas 2016; Juan et al., 2019).

Dentre as principais espécies do gênero, destaca-se a *Klebsiella pneumoniae*, caracterizada como aeróbia facultativa, em forma de bacilo não esporulado e imóvel, produzindo colônias grandes e mucóides (Choby, Howard-Anderson, Weiss, 2020). Cepas de *K. pneumoniae* são responsáveis por um número significativo de infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar, podendo colonizar a pele, faringe, bexiga e trato gastrointestinal. É uma das principais causas de pneumonia associada à ventilação mecânica, bacteremia, sepse, infecções no trato urinário, de tecidos moles e doença pulmonar crônica resultando no aumento da morbidade e mortalidade dentro e fora dos hospitais devido, principalmente, à sua capacidade de infecção e dificuldade no tratamento (Pawar et al., 2003; Pitout et al., 2005; Souza Lopes et al., 2005; Wang et al., 2013; Chung The et al., 2015; Paczosa, Meccas, 2016; Ma et al., 2019).

*K. pneumoniae* vem ganhando atenção tanto devido ao aumento do número de infecções quanto ao aumento do número de cepas resistentes aos antibióticos. De acordo com o U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2018), a Organização Mundial da Saúde

(OMS, 2016) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013), *K. pneumoniae* é classificada como um patógeno de tratamento urgente devido ao aumento constante no número de infecções invasivas ao longo dos últimos anos, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade. Além disso, apresenta relevância crescente na condição de patógeno oportunista, causando infecções em pacientes imunocomprometidos e/ou em pacientes que possuam uma doença de base, normalmente relacionada ao trato gastrointestinal (Haryani et al., 2007; Trabulsi, Alterthum., 2008; Woldu, 2016; Krapp, 2017). Mais de um terço dos isolados de *K. pneumoniae* apresentam o fenótipo de resistência a pelo menos um grupo dos principais agentes antimicrobianos utilizados como primeira escolha para tratamento de infecções: fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração e aminoglicosídeos (Bengoechea, Pessoa, 2019). Além disso, *K. pneumoniae* é considerada um reservatório conhecido de genes resistentes a antibióticos, que podem se espalhar para outras bactérias Gram-negativas, resultando em poucas opções terapêuticas, principalmente quando apresentam resistência adicional aos carbapenêmicos (MC Lam et al., 2018; Bengoechea, Pessoa, 2019).

De acordo com o Antimicrobial Surveillance Program, entre os anos de 2005 a 2015, cepas de *K. pneumoniae* demonstraram um aumento nas taxas de resistência. Os perfis de resistência variaram consideravelmente entre os países, onde o leste e o sudoeste Europeu, bem como os países mediterrâneos, foram observados como endêmicos para *K. pneumoniae* MDR apresentando perfil de resistência acima de 50% principalmente para cefalosporinas de terceira geração, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Enquanto em 2005, quase todas as regiões do mundo não apresentavam cepas de *K. pneumoniae* com perfil de resistência a carbapenêmicos, em 2015, diversos países, incluindo Romênia, Itália e Grécia, atingiram taxas de 60% de cepas resistentes aos carbapenêmicos (Navon-Venezia, Kondratyeva, Carattoli, 2017).

Interessantemente, *K. pneumoniae* apresenta-se entre os cinco patógenos mais frequentemente isolados na América Latina, sendo o segundo principal agente etiológico de infecções relacionadas ao trato urinário, o terceiro responsável por infecções na corrente sanguínea e o quarto principal patógeno causador de pneumonias, além de estar também relacionada com infecções de pele. No Brasil, estudos anteriores reportaram *K. pneumoniae* como o terceiro agente causador de IRAS, relacionada com 12,1%-16,9% das infecções em Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) (Gales et al., 2012; Jones et al., 2013; Sivert et al., 2013).

No ambiente hospitalar, o número de infecções por *K. pneumoniae* pode aumentar de acordo com o tempo de internação do paciente associado ao maior uso de antibióticos, contribuindo para o aumento de cepas multirresistentes. Dentre outros fatores, a transmissão do

microrganismo de paciente para paciente é facilitada pelas mãos dos profissionais da saúde, que podem atuar como carreadores transitórios. *K. pneumoniae* é uma importante causa de IRAS, sendo responsável por aproximadamente 8% das infecções hospitalares (Wilksch et al., 2011; Navon-Venezia, Kondratyeva, Carattoli, 2017).

*K. pneumoniae* pode ser encontrada em diversos locais da natureza, incluindo vegetação, solo, águas superficiais, bem como a colonização de superfícies mucosas em humanos e outros animais (Stahlhut et al., 2012; Barati et al., 2016). Embora não haja amplo estudo sobre a importância clínica dessa espécie encontrada no ambiente, em particular, águas superficiais e costeiras, estudos demonstram uma crescente preocupação com a disseminação de cepas MDR de *K. pneumoniae* em ambientes aquáticos, resultando em um efeito direto ou indireto na saúde humana. Estudos demonstraram a presença de cepas MDR de *K. pneumoniae* oriundas de esgoto, águas residuais de hospitais e água de rio em países industrializados e em desenvolvimento (Kang et al., 2006; Woodford et al., 2014; Khan et al., 2018).

Ambientes aquáticos localizados em regiões metropolitanas vêm sendo afetados diretamente pelo despejo de poluentes orgânicos, incluindo esgoto e/ou efluente doméstico e hospitalar. O despejo de efluente hospitalar é caracterizado pela presença de cepas bacterianas expressando resistência a diversos agentes antimicrobianos, além de apresentar níveis significativos de agentes antimicrobianos e biocidas ativos dispersos no meio ambiente. Ambientes que recebem água contaminada oriundas de ambiente hospitalar são considerados fontes primárias de bactérias resistentes a agentes antimicrobianos, agindo como local ideal para evolução e disseminação de patógenos, incluindo *K. pneumoniae* (Verlicchi, 2012; Jin et al., 2018).

Uma vez que o esgoto proveniente do hospital é amplamente diluído nas estações de tratamento, a presença de bactérias resistentes no ambiente aquático é preocupante, pois sugere que as águas residuais domésticas podem conter uma grande quantidade de agentes antimicrobianos de amplo espectro e sanitizantes, resultando na evolução da resistência a agentes antimicrobiana na comunidade (Picão et al., 2013).

Ambientes aquáticos apresentando cepas MDR de *K. pneumoniae* são considerados potenciais reservatórios de genes devido à capacidade de aquisição e troca de material genético, que podem conferir resistência a diversos grupos de agentes antimicrobianos, além de albergar genes de virulência (Lupo et al., 2012; Lubbert et al., 2017; Hladicz et al., 2017). A detecção de cepas MDR com elevado potencial patogênico em rios urbanos é uma importante evidência epidemiológica que demonstra o alto grau de disseminação de bactérias resistentes no meio ambiente (Oliveira et al., 2013). Apesar de sua natureza específica, diversos estudos relatam

que *K. pneumoniae* de origem ambiental é considerada altamente similar a amostras clínicas no que diz respeito a características fenotípicas; entretanto, apesar de similaridades genéticas, existem diferenças relacionadas aos fatores de virulência e capacidade de infecção quando comparadas com cepas de origem hospitalar (Podschun et al., 2001; Struve, Krogfelt, 2004; Davis et al., 2015; Runcharoen et al., 2017).

Dentro do ambiente hospitalar, é comum a utilização de agentes antimicrobianos de amplo espectro com o intuito de combater infecções. Antimicrobianos são substâncias químicas produzidas por microrganismos ou de forma sintética capazes de inibir o crescimento ou matar cepas bacterianas e, por vezes, outros microrganismos. Baseando-se em sua estrutura química, os agentes antimicrobianos podem ser divididos em várias classes, tais como beta-lactâmicos, glicopeptídeos, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamídeos, tetraciclina, fenicol, fluoroquinolonas, sulfonamidas, polimixinas, entre outras. Dentre as classes dos agentes antimicrobianos, os beta-lactâmicos, com destaque para os carbapenêmicos no ambiente hospitalar, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas são as mais utilizadas para o tratamento de bactérias Gram-negativas (Rossi, Andreazzi, 2005; Tavares, 2009; Durand, Raoult, Dubourg, 2019).

Os agente antimicrobianos vem sendo utilizados para o tratamento de uma ampla variedade de infecções e são indispensáveis em tratamentos médicos como: terapia intensiva, transplante de órgãos, quimioterapia, cuidados com bebês prematuros e procedimentos cirúrgicos. Apesar de tratamentos de infecções não poderem ser realizados de maneira eficiente sem a disponibilidade de drogas antimicrobianas eficazes, a resistência aos agentes antimicrobianos tornou-se um problema de saúde pública global, já que os organismos causadores de infecções estão se tornando resistentes a inúmeras classes de antimicrobianos, resultando em doenças prolongadas e maior risco de morte (Hawkey, 2008; Marti, Variatza, Balcázar, 2014b; Breijyeh, Jubeh, Karaman, 2020). Os principais mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos descritos até o presente momento são: efeito sobre a síntese da parede celular, inibição da síntese protéica, efeito sobre estrutura e função da membrana celular, interferência na síntese do ácido nucleico e atividade antimetabólica ou competitividade antagônica (Tavares, 2009; Durand, Raoult, Dubourg, 2019).

Amostras de *K. pneumoniae* são comumente resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos e geralmente apresentam genes de resistência que podem se disseminar para outros patógenos. A alta prevalência de *K. pneumoniae* em casos de infecções hospitalares, associada à sua capacidade de aquisição de genes de resistência, tem levado essa espécie a alcançar notoriedade como patógeno responsável por diversos surtos de infecções, uma vez que

ela vem apresentando resistência aos principais antimicrobianos de primeira escolha para tratamento: beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluorquinolonas. A presença de amostras resistentes a três ou mais grupos de antimicrobianos caracteriza essas cepas como multirresistentes (MDR), que têm sido responsáveis por diversos tipos de infecções em diferentes unidades hospitalares de vários países (Kiffer et al., 2005; Hennequin, Robin, 2016).

Agentes antimicrobianos são amplamente utilizados não só em humanos, mas também na medicina veterinária e na agricultura. Estudos revelam que a utilização de agentes antimicrobianos na comunidade representa mais de 85% do total do consumo, incluindo o setor hospitalar. As principais fontes de contaminação aquática ocorre através da eliminação de medicamentos não utilizados ou expirados em sanitários, bem como a excreção humana. Devido as suas propriedades químicas, os agentes antimicrobianos são removidos de forma incompleta durante o processo de tratamento de esgoto afetando negativamente a biota aquática e a população microbiana. Outro problema relacionado a liberação de agente antimicrobianos no ambiente aquático é o desenvolvimento de bactérias resistentes através da aquisição de genes que conferem resistência a diversos agentes antimicrobianos. Sendo assim, mesmo em concentrações subinibitórias, as cepas de *K. pneumoniae* podem adquirir resistência através da troca de material genético (Lupo et al., 2012; Munita, Arias, 2016; Giebultowicz et al., 2017; Felis et al., 2019; Kumar et al., 2019).

*K. pneumoniae* com perfil MDR apresentam diversos riscos, principalmente quando apresentam resistência aos agentes antimicrobianos de “último recurso”. Por ser considerado um patógeno oportunista, cepas MDR de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase muitas vezes combinam resistência a beta-lactamases, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, deixando poucas opções de terapêutica. Atualmente, perfis de multirresistência associados com fatores de virulência vem sendo observada em populações amplamente distintas de *K. pneumoniae*, incluindo cepas encontradas no ambiente aquático. Entretanto, o conhecimento dos mecanismos de patogenicidade pelo quais *K. pneumoniae* é capaz de causar doenças de origens diversas ainda permanecem pouco compreendidos, dificultando assim a compreensão do surgimento de cepas de alto risco (Munoz-Price et al., 2013; Blin et al., 2017).

Dentre os principais grupos de agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae*, os beta-lactâmicos vêm sendo amplamente utilizados e incluem penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenêmicos e inibidores de beta-lactamase. Até o início dos anos 1980, infecções por *K. pneumoniae* eram tratadas com cefalosporinas de terceira geração. Contudo, em 1983, foram descritas cepas bacterianas capazes de hidrolisar cefalosporinas e com resistência a penicilinas e aztreonam. Cepas

apresentando as enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), principalmente das variantes dos genes SHV e TEM, vêm causando surtos infecciosos no mundo todo. Até o presente momento, já foram descritos mais de 160 tipos de TEM e 180 tipos de SHV (Knothe et al., 1983; Cantón, Coque, 2006; Calbo, Garau, 2015; Hennequin, Robin, 2016). Interessantemente, no início da década de 1990, foi descrita uma nova família de ESBL, proveniente de cepas ambientais, denominada CTX-M. Desde a sua descrição, essas enzimas expandiram-se entre a família Enterobacteriaceae e são agora o tipo ESBL dominante, sendo a CTX-M-15 a principal enzima observada em *K. pneumoniae* (Bauernfeind, Grimm, Schweighart, 1990; Pitout, Laupland, 2008; Calbo, Garau, 2015).

Desde 2010, a propagação de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL em todo o mundo não demonstrou sinais de diminuição e diversos estudos sobre a disseminação de ESBLs CTX-M na comunidade vem sendo relatado anualmente não só em pacientes ambulatoriais, como também em indivíduos saudáveis em áreas geográficas distintas (Randrianirina et al., 2009; Calbo et al., 2011; Chong, Shimonda, Shimono, 2018).

A presença do gene CTX-M-15 vem sendo detectado no mundo todo tanto no ambiente hospitalar quanto comunitário, incluindo ambientes aquáticos. Deste modo, surtos hospitalares podem se originar de uma fonte comunitária. A presença desse gene vem sendo associada com cepas MDR de *K. pneumoniae* potencialmente patogênicas e de difícil tratamento. Infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL estão associadas a outros mecanismos de resistência, que envolvem diversas classes de antimicrobianos como fluoroquinolonas, cotrimoxazol e aminoglicosídeos e resultam no aumento da morbidade, mortalidade e custos associados à assistência à saúde (Randrianirina et al., 2009; Calbo et al., 2011; Dolejska et al., 2011; Hasse et al., 2020).

Atualmente, cepas de *K. pneumoniae* apresentam alta taxa de resistência para as enzimas produtoras de ESBL e resistência aos beta-lactâmicos mais comuns, como cefalosporinas e monobactâmicos. Como consequência, o uso de carbapenêmicos para o tratamento de infecções causadas por essas cepas se tornou cada vez mais frequente. Entretanto, o uso inadequado e prolongado dos carbapenêmicos resultou na seleção e propagação acelerada e abrangente de cepas resistentes a esses antimicrobianos dificultando cada vez mais o diagnóstico e tratamento de infecções (Curião et al., 2010; Sousa, Ramalho, Camargo, 2020). *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) foi inicialmente descrita em 1996, nos Estados Unidos da América, desde então, 24 variantes foram descritas tanto na Europa quanto na América Latina (Rojas et al., 2018). Amostras KPC são responsáveis por infecções nosocomiais graves e estão associadas a altas taxas de morbidade e

mortalidade (Hirsch, Tam, 2010; Cuzon et al., 2010). A emergência e capacidade de disseminação de cepas resistentes aos carbapenêmicos são atribuídas à mobilidade de elementos genéticos associados à presença do gene blaKpC. Atualmente, amostras KPC são consideradas um grave problema de Saúde Pública, uma vez que restam poucas opções para o tratamento de infecções causadas por essas bactérias. Estirpes produtoras de carbapenemase são caracterizadas por resistência a todos os beta-lactâmicos, incluindo cefalosporinas, e também a fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (Walsh, 2010; Henriques et al., 2012; Rojas et al., 2018).

A disseminação global de cepas produtoras de carbapenemase foi demonstrada em rios em diferentes regiões do mundo, incluindo no Brasil (Chagas et al., 2011; Zhang et al., 2012; Araujo et al., 2016). O esgoto hospitalar, contendo resíduos de agentes antimicrobianos, pode estar associado à descarga de bactérias produtoras de KPC em rios urbanos, criando um cenário perfeito para a troca de material genético entre patógenos clínicos e amostras ambientais, levando à evolução e seleção de novas espécies resistentes na comunidade (Mathers et al., 2018; Lepuschitz et al., 2019).

Os aminoglicosídeos estão entre os antimicrobianos de amplo espectro mais utilizados na prática clínica para o tratamento de infecções, apesar da atividade nefrotóxica (Yan et al., 2004; Shields et al., 2016). O mecanismo mais comum de resistência aos aminoglicosídeos surge da modificação enzimática que torna os aminoglicosídeos incapazes de se ligarem ao sítio aminoacil do rRNA 16S com uma falha subsequente em inibir a síntese de proteínas, através da presença de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos – EMAs. As EMAs podem ser divididas em três famílias: (i) aminoglicosídeo N-acetiltransferases (AACs), (ii) aminoglicosídeo O-fosfotransferases (APHs) e (iii) aminoglicosídeo O-nucleotidiltransferases (ANTs), que resultam em resistência clinicamente relevante (El-Badawy et al., 2017). Existem diversas enzimas dentro dessas famílias, que diferem em sua capacidade de modificar os aminoglicosídeos, como aac(2'), aac(3), aac(6'), ant(2'') e aph(3'), sendo codificados por genes presentes em integrons ou transposons, transportados por plasmídeos conjugativos (Galimand et al., 2003; Tavares, 2009; Fernandez-Martinez et al., 2017). Além disso, uma ou mais enzimas podem estar presentes no mesmo organismo, sendo assim, esses elementos podem ter acelerado a rápida disseminação dos genes de EMAs (Fernandez-Martinez et al., 2017).

Os antimicrobianos da classe das quinolonas são amplamente utilizados tanto para infecções associadas a comunidade quanto a hospitais. Devido ao seu uso contínuo, cepas de enterobactérias, incluindo *K. pneumoniae*, passaram a apresentar perfil de resistência contra esses fármacos (Wang et al., 2004; Macdougall et al., 2005; Marti, Variatza, Balcazae, 2014). As quinolonas entram nas células bacterianas de Gram-negativos através de porinas ou

atravessando as membranas externa e citoplasmática e inibem a ação da DNA girase e topoisomerase IV (Marti, Variatza, Balcazae, 2014b). Existem quatro mecanismos conhecidos de resistência que atuam separadamente ou em conjunto, resultando em diferentes graus de resistência, que vão desde a susceptibilidade reduzida, até resistências clinicamente relevantes: (i) alteração do alvo por Qnr, (ii) modificação da droga pelo aminoglicosídeo acetiltransferase AAC (6')-Ib-cr, que pode reduzir a atividade da ciprofloxacina, e (iii) ativação da bomba de efluxo por duas quinolonas bombas de efluxo, que são conhecidas como OqxAB e QepA (Jacoby, Strahilevitz, Hooper, 2014). As proteínas Qnr protegem a DNA girase e a topoisomerase IV da atividade inibitória das quinolonas e existem seis genes qnr diferentes: qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS, e o mais recentemente relatado, qnrVC. A inativação enzimática de quinolonas surge da aminoglicosídeo acetiltransferase AAC (6')-Ib-cr, devido à sua capacidade de conferir resistência não só aos aminoglicosídeos, mas também a ciprofloxacina e norfloxacina, encontrando-se bem disseminada entre as enterobactérias. Esse gene vem sendo associado à presença de genes das famílias QNR, CTX-M, SHV e KPC, contidos em um mesmo cassete de genes em diferentes integrons (Kim, Aga, 2007; Sabtcheva et al., 2008; Chmelnisky et al., 2009; Ramirez, Tolmasky, 2010; Jiang et al., 2011). Finalmente, consideramos PMQR atribuído a bombas de efluxo de quinolona (QepA) que especificamente expulsam quinolonas de células bacterianas. QepA pertence à família dos principais facilitadores que diminui a suscetibilidade às fluoroquinolonas hidrofílicas, especialmente ciprofloxacina e norfloxacina (Jacoby, Strahilevitz, Hooper, 2014; El-Badawy et al., 2017).

Embora patógenos resistentes a antimicrobianos sejam o foco principal nas investigações de genes de resistência antimicrobiana, o ambiente aquático tem se mostrado um reservatório para genes PMQR e, mais especificamente, tem sido sugerido que esses genes tenham se originado de bactérias ambientais, como a *Shewanella* spp., que habita principalmente ambientes aquáticos (Wang et al., 2004; Marti, Variatza, Balcazae, 2014). Portanto, compreender a prevalência dos genes PMQR, sua correlação entre si e outros genes de resistência antimicrobiana, bem como a sua distribuição em ambientes aquáticos, nos dará uma boa ideia sobre o quadro completo da extensão e prevalência de genes PMQR no ambiente (Yan et al., 2017).

A facilidade de cepas de *K. pneumoniae* adquirir elementos genéticos móveis é um fator chave para sua disseminação não só no que diz respeito à possibilidade de se tornar resistente aos diversos agentes antimicrobianos, mas também de evoluir para fenótipos mais virulentos em decorrência da presença de genes que podem favorecer a sobrevivência dos microrganismos. No entanto, em *K. pneumoniae*, a relação entre resistência e virulência é uma

questão complexa, uma vez que ainda falta uma compreensão sistemática de sua estrutura populacional (Fasciana et al., 2019).

Na última década, cepas virulentas de *K. pneumoniae* foram reconhecidas pela primeira vez em Taiwan e surgiram como a principal causa de abscessos hepáticos, meningite, bacteremia e sepse, além de infecções metastáticas que alcançam o cérebro, olhos, pulmões e outros órgãos em pacientes adultos saudáveis (Muller, et al., 2005; Yang, Lin, Wang, 2008; Khaertynov et al., 2018). A disseminação de cepas virulentas de *K. pneumoniae* vem sendo observada em diferentes regiões do mundo. O elevado potencial de virulência dessas cepas está relacionado a capacidade de formação de biofilme, hipermucoviscosidade, aumento da produção de cápsulas, presença de fimbrias, capacidade de aderir, invadir e permanecer viável dentro da célula do hospedeiro, além do sistema de captação de ferro (Chung et al., 2015; Khaertynov et al., 2018; Moghadas et al., 2019). Estudos anteriores documentaram a presença de fatores de virulência, como pili, resistência sérica e sideróforos, em estirpes de *K. pneumoniae* originárias de ambiente aquático (Podschun et al., 2001; Barati et al., 2016). Apesar de nos últimos anos terem sido detectadas cepas de *K. pneumoniae* apresentando combinação de resistência aos diferentes agentes antimicrobianos com perfis de virulência, as propriedades de resistência e virulência e suas variações genéticas e fenotípicas de cepas transmitidas por via aquática permanecem desconhecidas (Bialek-Davenet et al., 2014; Paczosa, Mescas, 2016; Surgers et al., 2016).

Dentre os diversos fatores relacionados com a virulência em cepas de *K. pneumoniae*, a presença de cápsula é um dos determinantes que tem sido considerado como o mais importante, uma vez que pode auxiliar na formação de biofilme e inibir a fagocitose, além de agir como uma barreira de proteção contra a ação dos agentes antimicrobianos. Foram detectados mais de 77 tipos de antígenos capsulares em cepas de *K. pneumoniae*, dos quais os sorotipos K1 e K2 são bem conhecidos e frequentemente associados ao fenótipo de hipermucoviscosidade e frequentemente detectados em casos graves de pneumonia e abscesso hepático (Compain et al., 2012; Paczosa, Mescas, 2016; Moghadas et al., 2019).

Outro importante fator de virulência é a expressão de adesinas fimbriais em *K. pneumoniae*, que facilitam a aderência a células epiteliais, bem como a superfícies abióticas (Piperaki et al., 2017). A adesina fimbrial tipo 1 (codificada pelo gene fimH) desempenha um papel significativo em infecções do trato urinário, enquanto que adesinas fimbriais do tipo 3 (codificada pelo gene mrkD) são capazes de mediar a interação de *K. pneumoniae* com diversas células humanas, incluindo células endoteliais e do epitélio dos tratos urinário e respiratório,

além de estarem diretamente relacionadas com a capacidade de produção de biofilme (Podschn et al., 2000; Paczosa, Meccas, 2016).

A capacidade de captação de ferro de *K. pneumoniae* é crítica para seu crescimento e replicação. Quatro moléculas de aquisição de ferro (sideróforos) foram descritas em *K. pneumoniae*: enterobactina, ersiniabactina, salmoquelina e aerobactina. O gene *kfuBC* tem um papel fundamental para a sobrevivência da bactéria pois contribui para o crescimento bacteriano e para a regulação de fatores de virulência, principalmente na formação de biofilme (Koczura, Kaznowski, 2003; Minandri et al., 2016). Dados recentes sugerem que cepas virulentas de *K. pneumoniae* tem a capacidade de produzir maior quantidade de moléculas de aquisição de ferro biologicamente mais ativas do que quando comparadas com cepas apresentando menor grau de virulência (Piperaki et al., 2017).

*K. pneumoniae* é capaz de formar biofilme, isto é, comunidades constituídas de formas celulares sésseis viáveis e aderidas a uma superfície e entre si, estando embebidas em uma matriz de substâncias extracelulares poliméricas capazes de aderir umas às outras e/ou a uma superfície (Di Luca et al., 2018; Rayet et al., 2017). Dentro do ambiente hospitalar, biofilmes formados por cepas de *K. pneumoniae* são geralmente encontrados em superfícies de cateteres e outros dispositivos implantados e também podem contribuir para a colonização do trato gastrointestinal, respiratório e urinário, além do desenvolvimento de infecções invasivas, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Sharma et al., 2011; Stahlhut et al., 2012). As células de *K. pneumoniae* dentro dos biofilmes são parcialmente protegidas das defesas imunológicas pois reduz a eficiência do complemento e da fagocitose, além disso, a capacidade de formação de biofilmes está relacionada com a resistência aos agentes antimicrobianos, uma vez que dentro do biofilme, as cepas bacterianas diminuem seu metabolismo, resultando na interrupção do crescimento que, por sua vez, diminui a eficiência dos agentes antimicrobianos que visam células metabolicamente ativas e em divisão (Nirwati et al., 2019). Alguns dos genes que codificam fatores de virulência detectados em *K. pneumoniae* também estão envolvidos na produção de biofilme, como o gene *cps* (cápsula), gene *mrkD* (fímbrias tipo 3) e os genes *wbbM* e *wzm* (pertencentes às enzimas codificadoras de agrupamento *wb* que constitui o LPS) (Boddicker et al. 2006; Balestrino et al. 2008; Alcántar-Curiel et al. 2013).

A capacidade de produção de biofilme pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo a disponibilidade de nutrientes no ambiente, sobretudo para as células localizadas nas camadas mais internas do biofilme. Os biofilmes atuam como fontes de infecção para outros sítios ambientais. Nos biofilmes maduros, as camadas mais externas liberaram células em seu estado planctônico, que começam a multiplicar e disseminar (Ray et al., 2017; Di Luca et al.,

2018). Para estirpes ambientais, a formação de biofilme atua auxiliando na capacidade de persistência bacteriana em ambientes com alta salinidade e variações de pH, temperatura, fontes de carbono e fluxo de fluidos (Boddicker et al., 2006; Yang, Zhang, 2008; Barati et al., 2016).

*Caenorhabditis elegans* foi estabelecido como sistema modelo para a investigação da patogênese e de fatores de virulência em *K. pneumoniae* (Kamaladevi, Balamurugan, 2014; Gerbara, Green-Harrison, Buret, 2017). Embora apresente estrutura física aparentemente simples, o nematódeo *C. elegans* possui alta complexidade nos níveis celulares e fisiológicos. O interesse pelo modelo consiste no fato de que muitos dos processos fisiológicos básicos e respostas ao estresse observados em organismos superiores (por exemplo, os seres humanos) são também perceptíveis em *C. elegans* (Pantel et al., 2016). A ingestão das bactérias pelos vermes resulta em infecção e, eventualmente, óbito (Lavigne et al., 2006). O tempo necessário para que as bactérias matem os vermes em comparação com a duração de vida observada quando os vermes são alimentados com a cepa de *Escherichia coli* OP50 é um marcador indireto do potencial de virulência das bactérias estudadas (Lavigne et al., 2013). *C. elegans* é um dos principais modelos de invertebrados com base em propriedades vantajosas, tais como tempo de vida curto, transparência, tratabilidade genética e facilidade de cultura usando dieta à base de *E. coli* OP50. Em seu habitat natural, composto de material vegetal em decomposição, este nematódeo se alimenta de bactérias (Lavigne et al., 2013; Gerbara, Green-Harrison, Buret, 2017). Apesar de ser um predador de bactérias, ele também pode ser infectado por bactérias Gram-positivas, tais como *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium striatum* e *Staphylococcus aureus*, e Gram-negativas, incluindo *Yersinia* spp. e *E. coli* (Kurz, Ewbank, 2000; Styer et al., 2005; Gerbara, Green-Harrison, Buret, 2017; Souza et al., 2019).

Os nematódeos são capazes de distinguir a qualidade dos alimentos, mostrando preferência por bactérias com maior valor nutricional (Shtonda, Avery, 2006). *C. elegans* é capaz de diferenciar bactérias por mecanismos de comportamento de proteção contra agentes patogênicos potenciais (Schulemburg, Ewbank, 2007). Enquanto a maioria das bactérias atrai *C. elegans*, algumas os repelem. Curiosamente, esse nematódeo é capaz de evitar patógenos e usa esse mecanismo como uma alternativa para o sistema imunológico adaptativo (Balla, Troemel, 2013; Meisel, Kim, 2014). Sua fácil manipulação genética, tendo em vista que seu genoma já foi totalmente mapeado, e a facilidade de manutenção contribuíram para seu sucesso e ampla utilização. Além disso, seu tamanho (~ 1 mm, quando em fase adulta), transparência, rápida reprodução, curto ciclo de vida de aproximadamente 21 dias, capacidade de ser congelado e a vantagem de ser um sistema in vivo com facilidades de manuseio encontradas em sistemas in vitro também são notáveis (Leung et al., 2008). Apesar de suas vantagens, como

qualquer modelo in vivo, há limitações intrínsecas em sua aplicação, por exemplo, ele não possui algumas vias moleculares e, também, não recria a completa fisiopatologia de determinadas doenças humanas. Portanto, é crucial definir os objetivos da pesquisa e ter em mente as possíveis restrições do modelo (Kalleta, Hengartner, 2006; Pantel et al., 2016).

Independente de expressão de toxinas e outros fatores de virulência, a presença de adesinas de *K. pneumoniae*, e conseqüentemente, a capacidade de aderência nas células hospedeiras são importantes determinantes de patogenicidade bacteriana, pois são indispensáveis para colonização e infecção (Mulvey, 2002; Castonguayet al., 2006; Hancock, Ferrières, Klemm, 2007).

Uma etapa essencial na colonização de tecidos e no desenvolvimento de infecção é a aderência da bactéria às células do hospedeiro por meio de adesinas fimbriais e não fimbriais associadas à superfície. Embora *K. pneumoniae* tenha sido inicialmente considerado um patógeno extracelular, vários estudos revelaram que a sua capacidade de invasão e persistência em células hospedeiras são propriedades cruciais para causar infecção, resultando em quadros recorrentes de infecções urinárias, além de explicar falhas no tratamento com antimicrobianos (Shaly et al., 2000; Rasko, Sperandio, 2010; Beceiro, Tomas, Bou, 2013; Dias et al., 2019). Adicionalmente, a interação bacteriana com células hospedeiras pode resultar em internalização, mantendo esses microorganismos protegidos de resposta imune. No entanto, mais dados relacionados com a capacidade de cepas *K. pneumoniae* aderir, invadir e permanecer no interior de células epiteliais humanas precisam ser elucidados (Chun-Ru et al., 2019; Dias et al., 2019).

A resistência antimicrobiana e a virulência bacteriana são mecanismos complementares que ajudam os microorganismos a sobreviver em ambientes adversos. Embora o potencial de virulência dos patógenos seja necessário para superar os mecanismos de defesa de células hospedeiras, a resistência aos agentes antimicrobianos é essencial para permitir que as cepas bacterianas também superem as terapias médicas (Chun-Ru et al., 2019; Dias et al., 2019). Atualmente, a presença e disseminação de cepas bacterianas com perfis MDR no meio ambiente aquático tem um papel fundamental para a transmissão de genes que codificam resistência aos agentes antimicrobianos, e que podem influenciar na incidência de doenças infecciosas no ambiente comunitário e nosocomial. Uma vez que foram relatados casos de infecções oriundas de cepas MDR de *K. pneumoniae* com perfis de virulência tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade, a análise de perfis clonais desses patógenos torna-se fundamental, assim como dos mecanismos de virulência que podem favorecer a capacidade de disseminação ambiental e infecção e sobrevivência no hospedeiro. Nesse sentido, compreender os mecanismos de

interação bacteriana relacionados ao potencial de virulência em diferentes ambientes, pode ser uma abordagem interessante para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para a resistência aos agentes antimicrobianos utilizados na prática clínica.

## 1. OBJETIVO

### 1.1. Objetivo geral

Análise de multiresistência a agentes antimicrobianos, perfis clonais e de mecanismos de virulência de amostras de *K. pneumoniae* obtidas de infecções nosocomiais e de águas fluviais.

### 1.2. Objetivos específicos

- a) Coleta de amostras de água de rios localizados na região urbana do Rio de Janeiro, incluindo um rio próximo a uma unidade hospitalar;
- b) Cultivo em meio seletivo e identificação das cepas de *K. pneumoniae* provenientes de águas fluviais e de infecções nosocomiais diversas utilizando técnica molecular Espectrometria de Massa MALDI-TOF;
- c) Avaliação da susceptibilidade a diferentes agentes antimicrobianos utilizados na prática clínica;
- d) Determinação dos perfis de resistência aos agentes antimicrobianos;
- e) Análise quantitativa da capacidade de formação de biofilme em superfícies abióticas do poliestireno e do vidro;
- f) Análise da capacidade de aderência, viabilidade intracelular e persistência bacteriana em células epiteliais humanas de linhagem CACO-2;
- g) Interação bacteriana utilizando o modelo experimental in vivo com nematódeos *C. elegans*;
- h) Pesquisa da presença de genes de resistência para beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, fluorquinolonas e carbapenêmicos utilizando ensaios da PCR;
- i) Identificação através de ensaios da PCR genes de virulência que codificam a presença de cápsula polissacarídica, fímbrias e captação de ferro;
- j) Investigação de perfis clonais de cepas MDR de *K. pneumoniae* pela técnica de Pulsed-field Gel de Electrophoresis.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Origem das amostras

Foram utilizadas amostras clínicas de origens diversas de *K. pneumoniae* (n=17), previamente isoladas durante o ano de 2016, preliminarmente identificadas no Laboratório de Bacteriologia - LABAC do Hospital Universitário Pedro Ernesto – HUPE da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ e mantidas estocadas na bacterioteca da Disciplina de Microbiologia e Imunologia - DIMI, da Faculdade de Ciências Médicas – FCM/UERJ: sangue (n=5), urina (n=4), secreção traqueal (n=3), escarro (n=2), líquido pleural (n=1), aspirado traqueal (n=1) e swab de orofaringe (n=1).

As amostras ambientais foram coletadas de diferentes locais do rio Joana, próximo à unidade hospitalar (HUPE) e do rio Maracanã, localizados na região metropolitana do Rio de Janeiro (Figura 1) no mês de agosto de 2016. As amostras foram coletadas utilizando recipientes estéreis e mantidos em gelo até a realização das análises microbiológicas. Alíquotas de 100 mL foram semeadas em caldo BHI (do inglês, “brain heart infusion”) 2x concentrado com agentes antimicrobianos: cefalexima (32  $\mu$ g/mL), gentamicina (8  $\mu$ g/mL) e imipenem (8  $\mu$ g/mL), e mantidas em estufa a 37°C durante 24h (Nogueira et al., 2015).

Figura 1 - Pontos de coleta das amostras ambientais obtidas nos rios Maracanã e Joana



## 2.2. Identificação bacteriana

As cepas obtidas de ambiente hospitalar e de ambiente aquático foram semeadas em meio seletivo ágar Mac Conkey e submetidas a identificação utilizando a espectrometria de massa MALDI-TOF. As amostras de *K. pneumoniae* foram estocadas em meio base acrescido de 20% de glicerol (GC medium base) a -20°C.

## 2.3. Avaliação da susceptibilidade, heterogeneidade e dos perfis de resistência aos agentes antimicrobianos

A determinação da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos foi realizada pela técnica de disco-difusão e interpretada segundo critérios do CLSI (2018). As cepas estocadas foram semeadas por esgotamento em MHA (Merck) e incubadas por 18h em estufa a 35-37°C. Posteriormente, foram preparadas soluções bacterianas em salina (0,85% NaCl) com turvação correspondente a 0,5 da escala de Mc Farland. Sobre a superfície inoculada em placas de MHA, foram depositados discos contendo os agentes antimicrobianos (Cefar, São Paulo, BRA) e incubadas por 18h em estufa a 35-37°C. A cepa de *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle para os discos de agentes antimicrobianos e a *E. coli* ATCC 35218 como controle para inibidor de beta-lactamase.

Foram utilizados os seguintes agentes antimicrobianos (Oxoid): cefalotina (30 µg), cefazolina (30 µg), cefoxitina (30 µg), cefuroxima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ceftazidime (30 µg), cefepime (30 µg), gentamicina (10 µg), amicacina (30 µg), kanamicina (30 µg), tobramicina (10 µg); ampicilina (10 µg), piperaciclina/taxobactam (100 µg/10 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (20 µg/10 µg), ampicilina/ sulbactam (10 µg/10 µg); ciprofloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg); imipenem (10 µg), ertapenem (10 µg), meropenem (10 µg), aztreonam (30 µg), cloranfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg), cotrimoxazol (25 µg), tigeciclina (15 µg) e polimixina B (10µg).

Após a leitura dos halos formados no teste de disco-difusão, as amostras que apresentaram perfil de resistência para três ou quatro classes diferentes de antimicrobianos

de interesse (quinolonas, aminoglicosídeos, carbapenêmicos e outros beta-lactâmicos) foram consideradas multirresistentes (Magiorakos et al., 2012; Nogueira et al., 2015).

#### 2.4. Ensaio fenotípico de detecção de produção de beta-lactamases e carbapenemases

Após a leitura dos halos formados no teste de disco-difusão, as cepas com perfil de resistência a cefalosporinas de 3ª e 4ª geração foram submetidas ao teste de inibição de beta-lactamase pelo ácido clavulânico e teste de aproximação de disco para a indicação de presença de ESBL, segundo o CLSI (2018). As cepas que apresentaram resistência aos carbapenêmicos testados foram submetidas ao teste com inibidores e potenciador para detecção de carbapenemase (ANVISA, 2013).

##### 2.4.1. Teste de inibição de beta-lactamase pelo ácido clavulânico

Em placas de MHA, foram inoculadas cepas de *K. pneumoniae* e depositados os discos contendo beta-lactâmicos isolados e conjugados com ácido clavulânico. Após incubação em estufa por 18h a 35-37°C, as cepas que apresentaram, nos discos conjugados, halo maior que 5 mm em relação aos discos contendo somente os  $\beta$ -lactâmicos, foram consideradas produtoras de ESBLs. Foi empregado neste teste cefotaxima e cefpodoxima, ambos associados ao ácido clavulânico (CLSI, 2014). A amostra de *K. pneumoniae* ATCC 700603 foi utilizada como controle positivo.

##### 2.4.2. Teste de aproximação de disco

Em placas de MHA, foram inoculadas cepas de *K. pneumoniae* e foram depositados, lado a lado, discos contendo ceftazidime, amoxicilina associada a ácido clavulânico e aztreonam, nesta ordem, com distância de 20 mm entre eles a partir de seus centros. As placas foram incubadas por 18h em estufa a 35-37°C e a leitura foi realizada a partir da observação de zona de inibição (ghost zone) nos espaços entre os discos. A amostra de *K. pneumoniae* ATCC 700603 foi usada como controle (CLSI, 2014).

### 2.4.3. Teste com inibidores e potenciador para detecção de carbapenemase

O teste com inibidores e potenciador para detecção de carbapenemase foi realizado de acordo com a nota técnica da ANVISA nº1/2013. Os ensaios foram realizados utilizando discos de meropenem e imipenem, com e sem adição de EDTA, cloxacilina (CLOXA) e ácido fenilborônico (AFB). Os discos de imipenem e meropenem foram depositados em tampas de placa de Petri estéril e adicionados 10 µl de solução de EDTA, CLOXA e AFB e mantidos durante 20 minutos aguardando a secagem. Em placas de MHA, foram inoculadas cepas de *K. pneumoniae* posteriormente foram dispostos os discos de antimicrobianos com e sem as soluções de EDTA, CLOXA e AFB. A cepa de *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle negativo e *K. pneumoniae* BR-1<sup>23</sup>, *K. pneumoniae* KPC-2<sup>6</sup> e *E. coli* CMY-2<sup>37</sup> como controles positivos, respectivamente, para os discos contendo EDTA, AFB e CLOXA.

As cepas que apresentaram diferença de diâmetro >5 mm no halo para os carbapenêmicos com EDTA em relação aos carbapenêmicos sem EDTA foram consideradas potenciais produtoras de metalo-betalactamase; diferença de diâmetro apenas com AFB como potenciais produtoras de KpC; diferença de diâmetro para AFB e CLOXA como possíveis produtoras de AmpC plasmidial e deficientes de porinas; enquanto as cepas que apresentaram diferença de diâmetro com AFB, CLOXA e EDTA foram consideradas mutantes deficientes em porinas ou produtoras de OXA-48.

## 2.5. **Detecção de genes por reação em cadeia da polimerase (PCR)**

### 2.5.1 Detecção de genes de resistência em cepas MDR de *K. pneumoniae*

Cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas tanto de ambiente hospitalar quanto do ambiente aquático, foram submetidas a ensaios de PCR utilizando oligonucleotídeos compatíveis com perfil de ESBLs, EMAs, QNRs e carbapenêmicos (**Tabela 1**). Para a pesquisa de genes que codificam ESBLs e carbapenemase, só foram analisadas as cepas que apresentaram resultados positivos nos testes de triagem descritos acima. As amostras de DNA foram obtidas através de fervura simples, onde a suspensão de uma colônia em 100 µL de água Milli-Q e as reações foram conduzidas em um volume final de 50 µL. Foram

preparadas misturas para cada par de oligonucleotídeos com todos os reagentes da reação, que depois foi dividida em alíquotas, às quais foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  de cada DNA alvo. As concentrações finais de cada componente da reação foram: 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de uma mistura de DNTPs, 20 pmol de cada *primer*, tampão de PCR 1x concentrado e 1,25 U *Taq* DNA Polimerase. As reações foram submetidas a ciclos de temperatura no termociclador DNA ThermalCycler (Eppendorf Mastercycler Gradient). Alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  de material amplificado foram depositadas juntamente com 10  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q em *slots* de E-gel 2% agarose (Invitrogen). A eletroforese e a visualização das amostras foram realizadas em E-gel safe imager<sup>TM</sup> Real-time transilluminator (Life Technologies).

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos referentes aos genes de resistência para ESBL, EMA, PMQR e carbapenêmicos, demonstrando as ciclagens individuais, o tamanho esperado do amplicons em pares de base e as referências utilizadas

Gene	Pb	Sequência de DNA	Ciclagem	Referência
<i>Bla<sub>TEM</sub></i>	503	R - TAA TTG TTG CCG GGA AGC TA F - TTG GGT GCA CGA GTG GGT TA	94° (10'); 94° (2'); 54° (1'); 72° (2') x 35 ciclos; 72° (7')	Arlet e Philipon, 1991
<i>Bla<sub>SHV</sub></i>	625	R - AGC AGG GCG ACA ATC CCG CG F - TCG GGC CGC GTA GGC ATG AT	94° (10'); 94° (2'); 60° (1'); 72° (2') x 35 ciclos; 72° (7')	Arlet e Philipon, 1991
<i>Bla<sub>CTX-M</sub></i>	499	R - AGC CGC CGA CGC TAA TAC A F - GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC	98° (2'); 94° (1'); 55° (1'); 72° (1') x 30 ciclos; 72° (10')	Pitout, Hossain, Hanson, 2004
<i>Bla<sub>ROHO</sub></i>	351	R - CGG TAG TAT TGT CCT TAA GCC F - GCG ACC TGG TTA ACT ACA ATC C	98° (2'); 94° (1'); 55° (1'); 72° (1') x 30 ciclos; 72° (10')	Pitout, Hossain, Hanson, 2004
<i>Bla<sub>KpC</sub></i>	101	R - CTC AGT GCT CTA CAG AAA AAC C F - TGT CAC TGT ATC GCC GTC	95° (5'); 95° (1'); 58° (30''); 72° (1'30'') x 35 ciclos; 72° (10')	Yigtiet <i>et al.</i> , 2001
<i>qnrA</i>	670	Up - AAG GAA GCC GTA TGG ATA TT Dw - AGC TAA TCC GGC AGC ACT AT	98° (2'); 94° (1'); 51° (1'); 72° (1') x 35 ciclos; 72° (7')	Jiang <i>et al.</i> , 2008
<i>qnrB</i>	515	Up - CGA CCT GAG CGG CAC TGA AT Dw - TGA GCA ACG ATG CCT GGT AG	98° (2'); 94° (1'); 60° (1'); 72° (1') x 35 ciclos; 72° (7')	Jiang <i>et al.</i> , 2008
<i>qnrD</i>	581	R - AAC AAG CTG AAG CGC CTG F - CGA GAT CAA TTT ACG GGG AAT A	94° (5'); 94° (1'); 50° (1'); 72° (1') x 30 ciclos; 72° (10')	Cavaco <i>et al.</i> , 2009
<i>qnrS</i>	571	Up - ACC TTC ACC GCT TGC ACA TT Dw - CCA GTG CTT CGA GAA TCA GT	98° (2'); 94° (1'); 60° (1'); 72° (1') x 35 ciclos; 72° (7')	Jiang <i>et al.</i> , 2008
<i>qepA</i>	403	R - CTG CAG GTA CTG CGT CAT G F - CGT GTT GCT GGA GTT CTT C	95° (10'); 95° (1'); 54° (1'); 72° (1') x 35 ciclos; 72° (10')	Cattoiret <i>et al.</i> , 2007
<i>aacC2</i>	237	R - CTC CGT CAG CGT TTC AGC TA F - ACT GTG ATG GGA TAC CGC TC	98° (2'); 94° (30''); 60° (45''); 72° (2') x 32 ciclos; 72° (7')	Van de Klundart e Vliegenthart, 1993
<i>aacC3</i>	415	R - AAC GGC ATT GAG CGT CAG F - GTT ACA CCG GAC CTT GGA	94° (5'); 94° (30''); 55° (30''); 72° (1') x 30 ciclos; 72° (8')	Antunes <i>et al.</i> , 2006
<i>aacC(6') -Ib-cr</i>	482	R - TTGCGA TGCTCTATGAGTGGCTA F - CTCGAATGCCTGGC GTGTTT	98° (10'); 94° (45''); 55° (45''); 72° (45'') x 34 ciclos; 68° (5')	Park <i>et al.</i> , 2006

### 2.5.2. Detecção de genes que codificam fatores de virulência diversos de cepas MDR de *K. pneumoniae*

Foram realizados ensaios de PCR utilizando *primers* de oligonucleotídeos compatíveis com produção de cápsulas de polissacarídeos (gene *K1* e *K2*), fímbrias (*fimH* e *mrkD*) e capacidade de captação de ferro (*KfuBC*), conforme previamente descrito (**Tabela 2**). As amostras de DNA foram obtidas através de fervura simples, a partir de suspensão de uma colônia em 100 µL de água Milli-Q e as reações foram conduzidas em um volume final de 50 µL. Foram preparadas soluções para cada par de oligonucleotídeos com todos os reagentes da reação, que depois foram divididas em alíquotas às quais foram adicionados 2 µL de cada DNA alvo. As concentrações finais de cada componente da reação foram: 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de uma mistura de DNTPs, 20 pmol de cada *primer*, tampão de PCR 1x concentrado e 1,25 U DNA Taq Polimerase. As reações foram submetidas a ciclos de temperatura no termociclador DNA ThermalCycler (Eppendorf Mastercycler Gradient). Alíquotas de 10 µL de material amplificado foi depositado juntamente com 10 µL de água miliq em slots de e-gel 2% agarose Invitrogen. A corrida e a visualização das amostras foram realizadas em E-gel safe imager<sup>TM</sup> Real-time transilluminator (Life Tech).

Tabela 2 - Desenho dos oligonucleotídeos referentes aos genes de virulência demonstrando as ciclagens individuais, os pares de bases e seqüências de DNA utilizadas para cada nucleotídeo, com as referências

<i>Gene</i>	<i>Pb</i>	<i>Sequencia de DNA</i>	<i>Ciclagem</i>	<i>Referências</i>
<i>K1</i>	1283	R- GCAATGGCCATTTGCCGTTAG F- GGTGCTCTTACATCATTGG	95° (15'); 94° (30"); 58° (90");	Fanget <i>al.</i> ; 2004
<i>K2</i>	641	R-CTGAAGTAAAATCGTAAATAGATGGC F- GACCCGATATTCATACTTGACAGAG	72° (90") x 35 ciclos; 72° (10')	Turton <i>et al.</i> ; 2010
<i>fimH</i>	423	R- GCATAATAACGTGCCTGGAAC F-GCTCTGGCCGATACTACGACGG	94° (5'); 94° (30"); 55° (30");	Brisseet <i>al.</i> ; 2009
<i>mrkD</i>	351	R- TATTGTCTTAATGGCGCTGG F- TAATCGTACGTCAGGTAAAG	72° (1') x 35 ciclos; 72° (1')	Brisseet <i>al.</i> ; 2009
<i>KfuBC</i>	1011	R- TTTCGTGTGGCCAGTGACTC F- GAAGTGACGCTGTTTCTGGC		Maet <i>al.</i> , 2005

### 2.6. Ensaios de formação de biofilme em superfícies abióticas

### 2.6.1 Preparo das suspensões bacterianas

As amostras de *K. pneumoniae* foram previamente cultivadas a 37°C por 24h em placas de ágar triptona de soja (TSA). Suspensões bacterianas foram preparadas em meio TSB (trypticase soy broth, Oxoid™) em turbidez equivalente a densidade óptica de 0,2 a 550nm ( $\sim 10^8$  UFC/ml).

### 2.6.2. Análise quantitativa de produção de biofilme em superfície hidrofóbica

A produção de biofilme em poliestireno foi avaliada quantitativamente conforme descrito previamente por Merritt, Kadouri e O'Tale (2005). Alíquotas de 200µl de suspensões bacterianas em TSB foram inoculadas em poços de placas de microtitulação contendo 96 poços e incubadas a 37°C por 24h. Após três lavagens com 200µl de solução salina estéril, foram adicionados 200 µl de cristal violeta a 0,2% em cada poço e incubados por 10 minutos. As placas foram lavadas duas vezes com água destilada e, depois de secas, foram adicionados aos poços 200 µl de álcool a 95%. A avaliação de formação de biofilme foi realizada por meio da leitura da densidade óptica em cada poço utilizando espectrofotômetro a 570nm. Foi utilizada como controle positivo a cepa de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e como branco, TSB estéril.

As cepas foram classificadas quanto à capacidade de produção de biofilme em quatro categorias com base na densidade óptica (DO): não produtora – DO obtidas menos que a DO do controle negativo (DOc); fracamente produtora –  $DOc < DO \leq (2x DOc)$ ; moderadamente produtora –  $(2x) DOc < DO \leq (4x DOc)$  e fortemente produtora –  $DO > (4x DOc)$ . Todos os ensaios foram feitos em triplicata e repetidos pelo menos em três ocasiões diferentes.

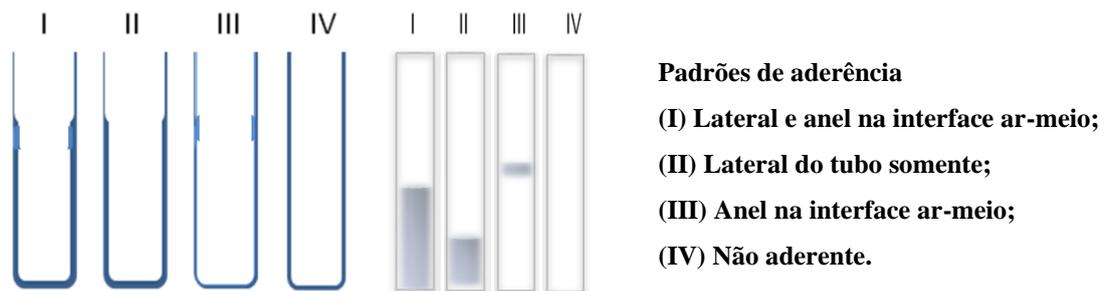
### 2.6.3 Análise quantitativa de produção de biofilme em superfície hidrofílica+

Tubos de ensaio (13x100 mm) contendo 5,0 mL de TSB foram utilizados para verificar a capacidade de produção de biofilme em superfície de vidro. Para tal, alíquotas das suspensões de *K. pneumoniae* ( $\sim 10^8$  UFC/ml) foram inoculadas nos tubos e incubados por 48h a 37°C.

Após esse período, cada cultura foi levemente homogeneizada por 5 segundos para remover células bacterianas não aderentes a superfície do vidro e o meio de cultivo foi dispensado. Novo meio de cultura foi adicionado aos tubos, que foram incubados novamente por mais 48h; esse processo foi repetido duas vezes. Após o terceiro descarte do meio de cultura, os tubos foram gentilmente lavados com PBS pH 7,2, colocados para secar a 37°C durante uma noite e corados por 5 minutos com solução de cristal violeta a 2%.

Os padrões de aderência revelados foram classificados de acordo com os seguintes critérios (**Figura 2**): I (+++) – bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar; II (++) – bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro; III (+) – bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar; e IV (-) – ausência de bactérias aderidas. Como controle positivo para o teste, foi utilizada a amostra de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (Mattos-Guaraldi; Formiga, 1991).

Figura 2 - Padrões de aderência na formação de biofilme em tubos de vidro



## 2.7. Ensaios de interação bacteriana com células endoteliais humanas

Os ensaios de interação bacteriana com células endoteliais humanas de linhagem CACO-2 foram realizados baseados em metodologias previamente descritas (Hirata Jr, 2004; Santos *et al.*, 2010). Quantidades equivalentes a  $5,0 \times 10^6$  células/ml foram utilizadas para a obtenção de tapete confluyente para os ensaios de aderência, invasão celular e persistência bacteriana em placas de cultura de células de 96 orifícios (Corning, USA).

Para a realização dos ensaios em cultura de células, cultivos estacionários foram lavados e ressuspensos em meio de cultura MEM (Eagle's Minimal Essential Medium; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). O inóculo bacteriano foi ajustado para uma contagem de  $10^8$  UFC/ml, equivalente à DO 0,2 de absorvância ( $\lambda = 570\text{nm}$ ) aferido em espectrofotômetro B295 II

(Micronal). Durante os experimentos, as monocamadas foram infectadas com  $10^6$  UFC/ml (MOI de 10) e  $10^7$  UFC/ml (MOI de 100). As contagens de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) das suspensões bacterianas utilizadas como inóculo, sobrenadantes de cultivos infectados e lisados diversos, foram realizadas por diluição seriada e cultivo em placas para contagem de colônias. O estudo foi realizado com tempo de infecção de 2h e 4h (Hirata Jr *et al.*, 2004).

As células bacterianas foram lavadas três vezes com PBS (0,01M; pH 7,2) e ressuspensas em MEM até alcançar a DO 0,2 ( $\lambda = 570\text{nm}$ ). As monocamadas celulares foram infectadas com 100 $\mu\text{l}$  das suspensões bacterianas e incubadas em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  no período de 2 horas e 4 horas. Concomitantemente ao período de incubação, foi preparada uma solução, na qual a gentamicina foi diluída em 10 mL de meio MEM. Após os períodos de infecção, 10  $\mu\text{l}$  do meio de cultivo celular foram reservados para a contagem de bactérias viáveis livres no sobrenadante e os tapetes celulares foram lavados três vezes com PBS para eliminação das bactérias não associadas e de resíduos do meio de cultivo celular. Os tapetes celulares foram, então, tratados com PBS contendo 0,1% de Triton X100 por 30 segundos, para que as células fossem lisadas. As alíquotas reservadas dos sobrenadantes e os lisados celulares foram diluídos e plaqueados em TSA, permitindo a contagem de bactérias viáveis associadas ao tapete.

Parte dos poços foi reservada para o ensaio de exclusão com antimicrobiano, sendo expostos a 100 $\mu\text{L}$  de solução de gentamicina (100 $\mu\text{g/ml}$ ) durante 1 hora, com a finalidade de eliminar bactérias extracelulares aderidas às monocamadas permitindo a contagem de bactérias internalizadas. As contagens resultaram no número total de bactérias associadas ao tapete (intracelulares + extracelulares) e no número de bactérias ocupando localização intracelular. Os percentuais de aderência foram calculados a partir das relações entre os números de bactérias associadas com as contagens de bactérias viáveis no sobrenadante somado ao número de células viáveis associadas às monocamadas. Já os percentuais de internalização foram calculados a partir da relação entre o número de bactérias viáveis intracelulares e o número de bactérias associadas (Hirata Jr, 2004; Santos *et al.*, 2010).

De forma similar ao ensaio de exclusão, alguns poços foram reservados para a avaliação da persistência, sendo, após a incubação de 2h e 4h, lavados e reincubados com 100  $\mu\text{l}$  de meio contendo gentamicina (100 $\mu\text{g/mL}$ ) por 24h para a eliminação de bactérias extracelulares. Em seguida, as monocamadas celulares foram novamente lavadas e lisadas. O lisado obtido foi

diluído e plaqueado em TSA. As placas foram incubadas por 48h a 37°C e as colônias foram contadas, obtendo-se o número de UFC/ml no lisado (Hirata Jr, 2004).

## 2.8. Ensaio de viabilidade de *Caenorhabditis elegans* como modelo de infecção *in vivo*

Os ensaios foram realizados conforme descrito previamente, sendo analisados pelo método de sobrevivência de Kaplan-Meier (Bono, Bargmann, 1998; Browning *et al.*, 2013; Antunes *et al.*, 2015a, 2015b). Resumidamente, nematódeos *C. elegans* N2 foram mantidos em placas contendo meio de crescimento de nematódeos (NGM) durante cerca de sete dias a 20 °C. Vinte vermes na fase larval L4 foram selecionados e transferidos para placas semeadas com 20 µl das suspensões bacterianas (D.O. 0,1  $\lambda$ =570nm). Os vermes foram avaliados diariamente após a infecção e os indivíduos mortos foram contados e removidos a cada 24h por 7 dias. Para cada cepa, 60 nematódeos (ensaios em triplicata) foram utilizados. A cepa *E. coli* OP50 foi utilizada como controle negativo.

## 2.9. Caracterização genotípica por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Todas as amostras MDR de *K. pneumoniae* foram submetidas à análise da clonalidade por técnica de PFGE, conforme anteriormente descrito por Gautom (1997).

### 2.9.1. Preparo das amostras

As amostras foram semeadas em meio TSA e incubadas por 24h a 35°C. A partir do crescimento obtido, foi feita uma suspensão bacteriana em tampão de suspensão celular com turbidez de 15% medida em espectrofotômetro. Desta suspensão, foram aliqüotados 200µl em um microtubo e acrescentados 10µl de proteinase K (solução estoque de 20mg/mL) e 5µl de lisozima (solução estoque de 40mg/ml). Então, os tubos foram invertidos gentilmente por 5 a 6 vezes para homogeneização (concentração final de proteinase K e lisozima = 1mg/ml). Em seguida, foram adicionados 200µl de agarose em cada um dos tubos e, após ser homogeneizada, a suspensão foi rapidamente distribuída em moldes para a formação dos blocos. Após a

solidificação da agarose, os moldes foram colocados em um tubo Falcon contendo 5,0 ml de tampão de lise celular e 25µl de proteinase K, com posterior incubação a 54°C sob agitação (120 RPM) por 2 horas. Após o período de lise, a solução foi retirada e em cada tubo foram adicionados aproximadamente 15ml de água ultrapura estéril pré-aquecida a 50°C e colocada novamente no agitador a 50°C, 120 RPM por 15 minutos. Este processo foi repetido por mais uma vez. Posteriormente, foram adicionados aproximadamente 15ml de TE pré-aquecido a 50°C e recolocados no agitador sob as mesmas condições, repetindo o mesmo processo por mais 3 vezes. No final das lavagens, foram adicionados 10ml de TE a temperatura ambiente e os blocos foram estocados a 4°C até o momento da digestão.

### 2.9.2. Digestão do DNA cromossômico as amostras com enzima de restrição

Os blocos foram cortados com uma lâmina em pedaços de 2,0 mm de espessura e transferidos para um microtubo contendo o tampão da enzima e incubados em banho-maria a 37°C por 10min. Foi preparada uma solução da enzima *XbaI* seguindo as instruções do fabricante (concentração final de enzima 50U/bloco). Após a incubação, os blocos foram colocados em microtubos com 100µL da solução da enzima e incubados em banho-maria a 37°C/16h-18h. Decorrido o período de incubação, a solução com a enzima foi retirada e substituída por 100µL de TBE 0,5x. As amostras foram mantidas a 4°C até o momento da eletroforese.

### 2.9.3. Preparo do gel e eletroforese

Foram preparados 100ml de gel de agarose (Sigma) a 1% em TBE 0,5x e, após sua solidificação, os blocos foram inseridos nos poços do gel. Posteriormente, o gel foi selado com a mesma agarose para impedir a saída dos blocos durante a eletroforese. Foi utilizada a cepa *Salmonella* Braenderup H9812 digerida com a enzima *XbaI* como marcador. A eletroforese foi realizada em equipamento CHEF DR III (BIO-RAD) a 6V/vm e temperatura de 14°C, nos seguintes parâmetros: Tempo Inicial 2,2s; Tempo Final 54,2s; Tempo de Corrida 19h. Após a eletroforese, o gel foi corado em brometo de etídio (0,5mg/mL) por 30min e lavado 2 vezes com

água destilada por 15min cada vez, com posterior observação em fotodocumentador (DNR – Bioimagins systems – Modelo MiniBis Pro).

#### 2.9.4. Análise dos perfis de bandas

A preparação do DNA cromossomal e a análise do PFGE foram realizadas de acordo com Nunes e colaboradores (2005) e Vivoni e colaboradores (2006). Os padrões de PFGE foram analisados por comparação visual entre as cepas e com o auxílio de análise automatizada por meio do programa Bionumerix, versão 6.0. Os coeficientes de similaridade dos dados foram calculados com tolerância de 1,5% de acordo com a posição da banda e o método UPGMA foi aplicado para análise dos clusters. Os isolados foram atribuídos usando coeficiente de similaridade baseado em banda com valor corte de 80%. Os padrões de bandas foram classificados de acordo com os critérios usados por Van Belkun e colaboradores (2007). Os pulsotipos de PFGE foram identificados por letras e os subgrupos foram identificados por letras seguidas de um número.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Origem e identificação das amostras

##### 3.1.1. Cepas isoladas de infecções nosocomiais

Durante o ano de 2016, foram recebidas do LABAC/HUPE um total de 17 cepas de *K. pneumoniae* coletadas de diferentes sítios de isolamento, incluindo sangue (n=5), urina (n=4), secreção traqueal (n=3), escarro (n=2), líquido pleural (n=1), aspirado traqueal (n=1) e swab de orofaringe (n=1) de pacientes com suspeita clínica de infecção (**Tabela 3**). Quadros infecciosos por *K. pneumoniae* foram observados em pacientes atendidos em diversos setores no HUPEe no Instituto Fernandes Figueiras (IFF). A maioria das cepas foi obtida de amostras clínicas oriundas de pacientes do CTI Geral. Em diferentes setores de atendimento infantil, foram isoladas amostras de *K. pneumoniae*: aspirado traqueal no setor de Pediatria; sangue no CTI pediátrico; urina na UTI Neonatal.

Tabela 3 - Isolamento e identificação de cepas de *Klebsiella pneumoniae* de origem hospitalar durante o ano de 2016

Número da cepa; Data de isolamento	Setor Hospitalar	Sítio de origem	MALDI-TOF
<b>B1</b> - 06/04	Cirurgia Cardíaca	Sangue	2.250
<b>B2</b> - 29/04	CTI Pediátrico	Sangue	2.114
<b>B4</b> - 03/05	CTIGeral	Secreção traqueal	2.039
<b>B5</b> -16/05	CTIGeral	Líquido pleural	2.259
<b>B7</b> - 16/05	-	Sangue	2.007
<b>B9</b> - 20/05	CTIGeral	Sangue	2.222
<b>B10</b> - 01/06	CTI Geral	Secreção traqueal	2.044
<b>B11</b> - 20/05	Pediatria	Aspirado traqueal	2.254
<b>B12</b> - 02/02	IFF*	Sangue	2.230
<b>B13</b> - 01/06	Doenças infecciosas	Swab de orofaringe	2.234
<b>B14</b> - 21/06	-	Escarro	2.238
<b>B15</b> -10/06	IFF*	Escarro	2.074
<b>B17</b> - 09/09	CTIGeral	Secreção traqueal	2.152
<b>B18</b> - 29/09	Ambulatorio	Urina	1.893
<b>B19</b> -27/09	Isolamento interno	Urina	2.042
<b>B20</b> -05/10	UTI Neonatal	Urina	2.049
<b>B23</b> -21/12	-	Urina	2.200

### 3.1.2. Cepas isoladas de águas fluviais

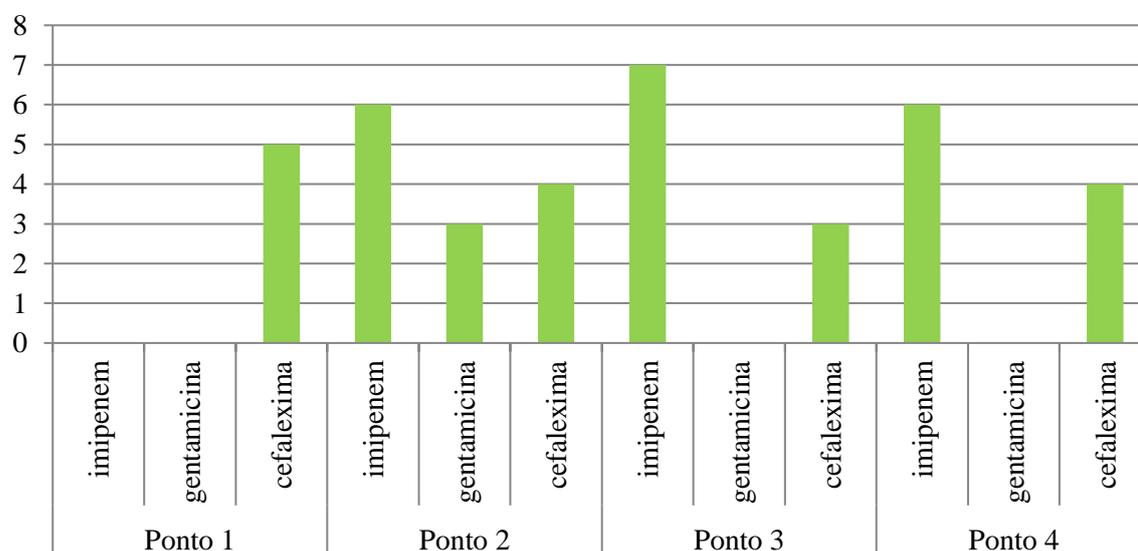
De acordo com as localizações apresentadas na figura 1, foram isoladas 38 cepas de *K. pneumoniae* (21,8%) dentre 174 cepas de microrganismos Gram-negativos a partir de amostras de água coletadas em quatro locais distintos: Rio Joana, onde foram selecionados dois pontos de coleta – em frente à estátua do Bellini (ponto 1; 5/74) e em frente ao Hospital Universitário Pedro Ernesto – HUPE (ponto 2; 13/32); A junção entre os rios Joana e Maracanã (ponto 3; 10/31) e no Rio Maracanã (ponto 4; 10/37).

O número de cepas isoladas de microrganismos Gram-negativos demonstrou variação decorrente do agente antimicrobiano adicionado ao meio de cultivo: Ponto 1 - imipenem (n=22), gentamicina (n=21) e cefalexima (n=31); Ponto 2 - imipenem (n=15), gentamicina (n=7) e cefalexima (n=10); Ponto 3 - imipenem (n=12), gentamicina (n=7) e cefalexima (n=12); Ponto 4 - imipenem (n=17), gentamicina (n=11) e cefalexima (n=9).

No ponto 1, cepas de *K. pneumoniae* foram isoladas apenas em meio de cultura acrescido de cefalexima (n=5); no ponto 2, cepas *K. pneumoniae* (n=13) foram isoladas com imipenem (n=7), gentamicina (n=7) e cefalexima (n=4); ponto 3, *K. pneumoniae* (n=10) observadas na presença de imipenem (n=7) e cefalexima (n=3); ponto 4, *K. pneumoniae* (n=10) presentes em meios seletivos com imipenem (n=6) e cefalexima (n=4) (**Gráfico 1**).

Todas as 38 cepas de *K. pneumoniae* isoladas de águas fluviais também foram identificadas pelo MALDI-TOF (score >2.0).

Gráfico 1 - Correlação do número de cepas fluviais de *Klebsiella pneumoniae* isoladas em cada ponto de coleta com o agente antimicrobiano adicionado ao meio seletivo



### 3.2. Perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos diversos

Dentre as 55 cepas de *K. pneumoniae*, sendo 17 isoladas de amostras clínicas de origens diversas e 38 de origem ambiental, nenhuma cepa apresentou resistência a tigeciclina e polimixina B. Entretanto, foi observada uma heterogeneidade nos níveis de susceptibilidade aos diversos agentes antimicrobianos de diferentes classes tanto nas amostras clínicas quanto nas cepas de origem ambiental. Conforme apresentado nas tabelas 4 e 5, foi observada a resistência para um número elevado de diversos agentes antimicrobianos utilizados na prática clínica tanto para as cepas isoladas de quadros de infecção quanto para aquelas isoladas de ambientes fluviais. O número de cepas isoladas do ambiente fluvial (n=37) apresentando resistência aos antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos foi significativamente maior quando comparado com o das cepas isoladas de infecções nosocomiais (n=2).

### 3.3. Expressão de perfis de multirresistência aos agentes antimicrobianos

Dentre as 55 cepas de *K. pneumoniae* estudadas, 45 (81,8%) foram classificadas como MDR, uma vez que apresentaram resistência a três ou mais grupos de antimicrobianos de interesse: aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, carbapenêmicos e outros beta-lactâmicos (**Tabela 4 e 5**).

Das 17 cepas de *K. pneumoniae* isoladas de casos de infecção hospitalar, sete (41,2%) foram consideradas MDR, incluindo a cepa B2 isolada de CTI pediátrico (sangue). Vale ressaltar que, das cepas MDR de *K. pneumoniae*, apenas duas apresentaram resistência aos carbapenêmicos, uma de CTI geral (secreção traqueal) e outra de ambulatório isolada em paciente com infecção urinária (**Tabela 4**).

Todas as cepas de *K. pneumoniae* isoladas de ambientes fluviais expressaram perfis de multirresistência (**Tabela 5**). As cepas apresentaram perfis MDR variados, expressando resistência para 11 a 23 drogas dentre os 27 agentes antimicrobianos das mais diversas classes testadas.

Tabela 4 - Cepas de *Klebsiella pneumoniae* expressando perfis de multirresistências isoladas de pacientes do Hospital Universitário Pedro Ernesto-UERJ

Sítios de isolamento	Amostras	Resistência aos agentes antimicrobianos
Sangue	B2	CFL/CFZ-CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM; GEN/KAN/TOB; AMP/AMC/ASB; CIP; ATM; SUT; TET
Sangue	B7	CFL/CFZ-CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM; KAN; AMP/AMC/ASB/PPT; CIP/NOR; ATM; CLO; SUT; TET
S. traqueal	B10	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM; AMP/AMC/ASB/PPT; CIP/NOR; IMI/ETP/MER; ATM; SUT
Sangue	B12	CFL/CFZ-CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM; GEN/KAN/TOB; AMP/AMC/ASB/PPT; CIP/NOR; ATM; SUT
Orofaringe	B13	CFL/CFZ-CRX-CTX/CRO/CAZ/CPM; GEN/TOB; AMP/AMC/ASB/PPT; CIP; ATM; CLO; SUT
Urina	B18	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CRO/CAZ/CPM; KAN; AMP/AMC/ASB/PPT; CIP/NOR; IMI/ETP/MER; ATM; CLO; SUT
Urina	B19	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM; GEN/KAN/TOB; AMP/ASB/PPT; CIP/NOR; ATM; CLO; SUT; TET

Legenda: Cefalosporinas de primeira geração: CFL=cefalotina; CFZ=cefazolina; Cefalosporinas de segunda geração: CFO= cefoxitina; CRX= cefuroxima; Cefalosporinas de terceira geração: CTX= cefotaxima; CRO= ceftriaxona; CAZ= ceftazidima; Cefalosporinas de quarta geração: CPM= cefepima; Aminoglicosídeos: GEN= gentamicina; AMI= amicacina; KAN= kanamicina; TOB= tobramicina; AMP= ampicilina; AMC= amoxicilina/ác. clavulânico; ASB= ampicilina/sulbactam; PPT= piperacilina/tazobactam; Fluorquinolonas: CIP= ciprofloxacina; NOR= norfloxacina; Carbapenêmicos: IMI= imipenem; ETP= ertapenem; MER= meropenem; ATM= aztreonam; CLO= cloranfenicol; SUT= trimetopim/sulfametoxazol; TET= tetraciclina.

Tabela 5 - Cepas de *Klebsiellapneumoniae* expressando perfis de multirresistência isoladas dos rios Joana e Maracanã, localizados na região urbana do Rio de Janeiro, Brasil

Ponto de isolamento	Antimicrobiano seletivo	Número da cepa	Resistência aos agentes antimicrobianos
Ponto 1	Cefalexima	P1C1	CFL/CFZ-CTX/CRO/CAZ-CPM;GEN;AMP;IMI;CLO;TET
		P1C2	CFL/CFZ-CTX/CRO/CAZ-CPM;GEN;AMP;IMI;CLO;TET
		P1C5	CFL/CFZ-CTX/CRO/CAZ-CPM;GEN;AMP;IMI;CLO;TET
		P1C25	CFL/CFZ-CTX/CRO/CAZ-CPM;GEN;AMP;IMI;CLO;TET
		P1C26	CFL/CFZ-CTX/CRO/CAZ-CPM;GEN;AMP;IMI;CLO;TET
Ponto 2	Imipenem	P2I2	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CRO-CPM;GEN;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM
		P2I3	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CRO-CPM;GEN/TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM
		P2I5	CFL/CFZ-CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM;SUT;TET
		P2I7	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM;TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM;SUT
		P2I11	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM;TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM;SUT
	Gentamicina	P2I12	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM;TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM;CLO;SUT;TET
		P2G1	CFL/CFZ/CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM;GEN/TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP;ATM;SUT
		P2G2	CFL/CFZ-CTX/CRO/CAZ-CPM;GEN/TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP;ATM;SUT
	Cefalexima	P2G9	CFL/CFZ-CRX/CTX/CRO/CAZ-CPM;GEN/TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM;SUT;TET
		P2C3	CFL/CFZ-CRX/CTX/CRO/CAZ-CPM;GEN/KAN;AMP/ASB;IMI;ATM;SUT
		P2C7	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM;GEN/KAN/TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;IMI/ETP;ATM;SUT;TET
		P2C8	CFL/CFZ-CRX/CTX/CRO/CAZ-CPM;GEN/TOB;AMP/AMC/ASB;CIP;IMI/ETP/MER;SUT;TET
	P2C9	CFL/CFZ-CRX/CTX/CRO/CAZ-CPM;GEN/AMI/KAN/TOB;AMP/ASB/PPT;CIP;IMI/ETP/MER;ATM;SUT;TET	
Ponto 3	Imipenem	P3I1	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CAZ-CPM;AMI/TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM;SUT
		P3I2	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CAZ-CPM;TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM;SUT
	Imipenem	P3I3	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CAZ-CPM;TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM;SUT
		P3I4	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CAZ-CPM;TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM;SUT
		P2I9	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CAZ-CPM;TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;SUT
		P2I10	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CAZ-CPM;TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM;SUT
		P2I11	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX-CPM;TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM;CLO;SUT
	Cefalexima	P3C6	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX-CPM;GEN/TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM;CLO;SUT;TET
		P3C7	CFL/CFZ/CRX-CTX/CAZ-CPM;GEN/TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP;IMI/ETP/MER;ATM;CLO;SUT
		P3C11	CFL/CFZ-CFO-CTX-CPM;GEN/TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR/IMI/ETP/MER;ATM;CLO;SUT;TET
Ponto 4	Imipenem	P4I10	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM;GEN;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM;CLO;SUT;TET
		P4I12	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM;TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM;CLO;SUT;TET
		P4I13	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM;TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM;SUT
		P4I14	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM;TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM;SUT
		P4I15	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM;TOB;AMP/AMC/ASB/PPT;CIP/NOR;IMI/ETP/MER;ATM;SUT

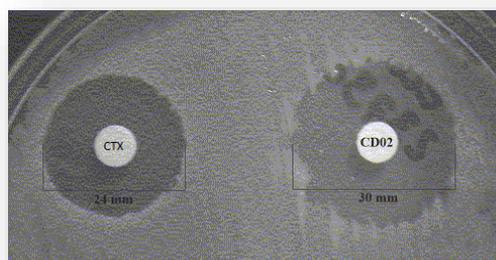
<b>Cefalexima</b>	<b>P4I17</b>	CFL/CFZ-CFO/CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM; TOB; AMP/AMC/ASB/PPT; CIP/NOR; IMI/ETP/MER; ATM; SUT; TET
	<b>P4C3</b>	CFL/CFZ-CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM; AMP/AMC/ASB/PPT; CIP; IMI/ETP/MER; ATM; SUT; TET
	<b>P4C4</b>	CFL/CFZ-CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM; GEN/TOB; AMP/AMC/ASB/PPT; IMI/ETP/MER; SUT; TET
	<b>P4C5</b>	CFL/CFZ-CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM; GEN/TOB; AMP/AMC/ASB; CIP; IMI/ETP/MER; ATM; SUT; TET
	<b>P4C9</b>	CFL/CFZ-CRX-CTX/CRO/CAZ-CPM; GEN/AMI; AMP/AMC/ASB/PPT; CIP; IMI/ETP/MER; ATM; SUT; TET

Legenda: Cefalosporinas de primeira geração: CFL=cefalotina; CFZ=cefazolina; Cefalosporinas de segunda geração: CFO= cefoxitina; CRX= cefuroxima; Cefalosporinas de terceira geração: CTX= cefotaxima; CRO= ceftriaxona; CAZ= ceftazidima; Cefalosporinas de quarta geração: CPM= cefepima/ Aminoglicosídeos; GEN= gentamicina; AMI= amicacina; KAN= kanamicina; TOB= tobramicina/ AMP= ampicilina; AMC= amoxicilina/ác. Clavulânico; ASB=ampicilina/sulbactam; PPT= piperaciclina/tazobactam/ Fluorquinolonas; CIP= ciprofloxacina; NOR= norfloxacina/ Carbapenêmicos; IMI= imipenem; ETP= ertapenem; MER= meropenem/ ATM= aztreonam/ CLO= cloranfenicol/ SUT= trimetopim/sulfametoxazol/ TET= tetraciclina.

### 3.4. Detecção da possível presença de beta-lactamase de espectro estendido (ESBLs) e carbapenemases

Como demonstrado nas figuras 2 e 3, todas as 45 cepas MDR de *K. pneumoniae* foram submetidas ao teste de inibição de beta-lactamase pelo ácido clavulânico e ao teste de aproximação de disco e apresentaram resultados positivos, indicando a possível presença de ESBLs tanto nas amostras isoladas de pacientes infectados quanto das amostras oriundas do ambiente.

Figura 3 e 4 - Teste de inibição de beta-lactamase pelo ácido clavulânico e ao teste de aproximação de disco



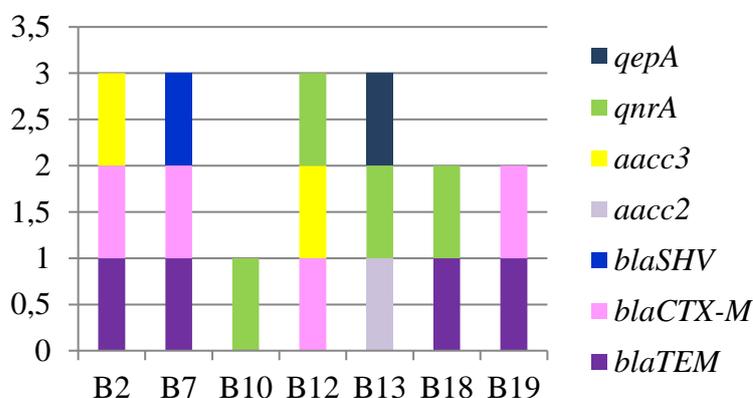
Dentre as cepas MDR de *K. pneumoniae* que apresentaram resistência a qualquer um dos carbapenêmicos testados, 37 (97,3%) cepas isoladas no ambiente fluvial foram indicativas para a presença de carbapenemase quando submetidas ao teste fenotípico de triagem. Entretanto, nenhuma das cepas isoladas de pacientes internados (B10 e B18) apresentaram perfil fenotípico para a presença dos genes relacionados à resistência aos carbapenêmicos.

### 3.5. Presença de genes que codificam resistência aos agentes antimicrobianos

A partir dos resultados obtidos nos testes fenotípicos, foi possível observar que das sete cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes infectados, cinco apresentaram

genes de resistência compatível com ESBL: *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* e *bla<sub>SHV</sub>*. Vale ressaltar que a cepa B7, isolada de infecção de corrente sanguínea, apresentou concomitantemente os três genes. Em relação aos carbapenêmicos, as duas cepas (B10 e B18) que apresentaram resistência aos carbapenêmicos testados, não apresentaram resultados positivos nos testes fenotípicos de triagem, portanto, não foi realizada a PCR para as amostras hospitalares. A análise das cepas hospitalares que apresentaram resistência aos aminoglicosídeos (n=3) demonstrou diferença na presença dos genes *aacc2* e *aacc3*. Foi possível observar que as cepas B2 e B12, ambas oriundas de infecção sanguínea, apresentaram o gene *aacc3* enquanto a cepa B13, isolada de orofaringe, apresentou o gene *aacc2*. Em relação às fluorquinolonas, todas sete as cepas apresentaram resistência aos antimicrobianos testados e foram analisadas quanto à presença dos genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrD*, *qnrS* e *qepA*. A maioria das amostras (n=4) apresentou o gene *qnrA*, enquanto os genes *qnrB*, *qnrD* e *qnrS* não foram detectados em nenhuma amostra. O gene *qepA* foi observado em apenas uma cepa (B13-orofaringe), que também foi positiva para o gene *qnrA* (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Cepas multirresistentes de *Klebsiellapneumoniae* isoladas de pacientes infectados carreando genes que codificam resistência - ESBLs\*, EMA\* e PMQR\*



Legenda\*: ESBLs- Beta-lactamase de Espectro Estendido; EMA- Enzima Modificadora de Aminoglicosídeo; PMQR- Plasmídeo Mediando Resistência a Quinolonas.

A análise dos resultados com as cepas ambientais isoladas em diferentes pontos demonstrou heterogeneidade em relação à expressão de ESBLs e presença dos genes *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* e/ou *bla<sub>TOHO</sub>*. Dentre as 38 cepas MDR de *K. pneumoniae*, 20 (52,6%) apresentaram genes de resistência compatíveis com ESBL: *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* e/ou *bla<sub>SHV</sub>*. Nenhuma cepa analisada apresentou o gene *bla<sub>TOHO</sub>*. Em todos os pontos analisados, foram detectadas cepas (n=11) apresentando o gene *bla<sub>CTX-M</sub>*, enquanto em três pontos, exceto o ponto 1 de coleta, foram observadas cepas (n=5) apresentando o gene *bla<sub>SHV</sub>*. Apesar de

terem sido observados em menor número, foram detectadas cepas MDR de *K. pneumoniae* (n=4) apresentando o gene *bla<sub>TEM</sub>* em todos os pontos de coleta, exceto no ponto 2.

Treze (34,2%) cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas do ambiente aquático apresentaram o gene *bla<sub>KpC</sub>*, que codifica resistência aos carbapenêmicos: imipenem, ertapenem e meropenem. Foi possível observar que todas as 13 cepas ambientais que codificavam o gene *bla<sub>KpC</sub>* apresentavam resistência ao imipenem. A maioria também expressou resistência a ertapenem (n=12) e meropenem (n=11) sendo detectadas em maior número no ponto de coleta próximo a unidade hospitalar, também incluída nesse estudo (HUPE/UERJ).

Dentre as 38 cepas MDR de *K. pneumoniae* testadas, 36 (94,7%) apresentaram diferentes perfis de resistência aos aminoglicosídeos testados: gentamicina (n=21), amicacina (n=3), kanamicina (n=3) e tobramicina (n=27). Próximo à unidade hospitalar estudada, foi possível observar que cinco cepas ambientais carregavam os genes *aacc2* e *aacc3*, apresentando resistência inclusive a tobramicina. A maioria das cepas isoladas de todos os pontos de coleta do meio fluvial expressou resistência a gentamicina e tobramicina.

Trinta (78,9%) cepas isoladas apresentaram resistência às fluorquinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina). Apesar de todas terem sido avaliadas quanto à presença dos genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrD*, *qnrS* e *qepA*, apenas seis cepas MDR de *K. pneumoniae* foram positivas para os genes *qnrA* (n=3) e *qnrB* (n=3). Dentre os genes testados, vale ressaltar que o gene *qnrA* foi detectado apenas no ponto 3 de coleta, enquanto o gene *qnrB* foi encontrado somente no ponto 4. Os genes *qnrD*, *qnrS* e *qepA* não foram encontrados em nenhuma das cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas no ambiente fluvial.

Em termos gerais, não foram detectados os genes codificadores de resistência investigados em três cepas (P1C1, P1C2 E P1C5). Em contraste, genes codificando resistência a diferentes classes de antimicrobianos foram observados nas seguintes cepas (n=11) de MDR de *K. pneumoniae* isoladas no ambiente fluvial: P1C25 (*bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>KpC</sub>*), P2I5 (*bla<sub>CTX-M</sub>* e *bla<sub>KpC</sub>*), P2I7 (*bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>KpC</sub>*), P2C3 (*bla<sub>SHV</sub>* e *aacc3*), P2C7 (*bla<sub>CTX-M</sub>* e *aacc3*), P2C8 (*bla<sub>KpC</sub>* e *aacc2*), P3I2 (*bla<sub>CTX-M</sub>* e *qnrA*), P3C6 (*aacc2* e *qnrA*) e P3C11 (*bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>KpC</sub>*) P4I12 (*bla<sub>TEM</sub>* e *qnrB*) P4I13 (*bla<sub>SHV</sub>* e *qnrB*) e P4C3 (*bla<sub>CTX-M</sub>* e *qnrB*) **(Gráfico 3a; Gráfico 3b; Gráfico 3c e Gráfico 3d).**

Gráfico 3 - Cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de ambiente fluvial carregando genes que codificam resistência -ESBLs\*, EMA\*, PMQR\* e carbapenêmicos

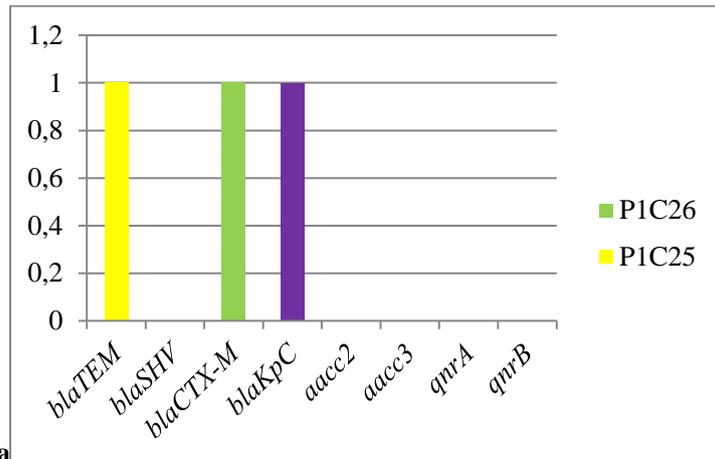


Gráfico 3a

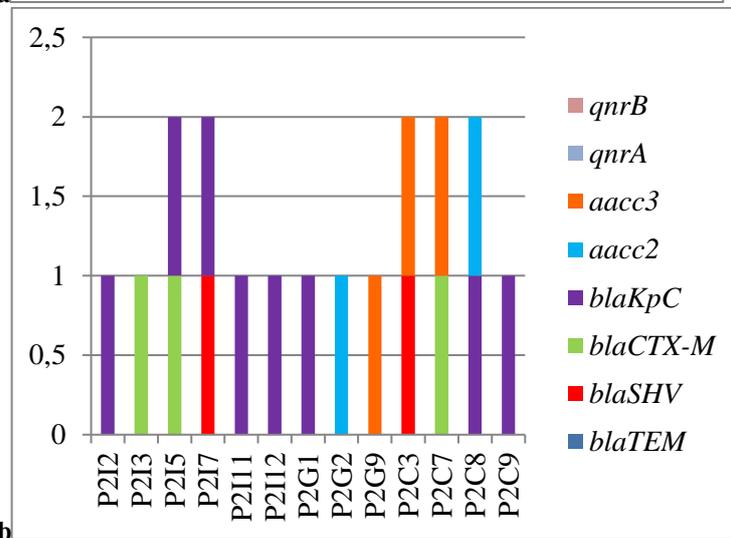


Gráfico 3b

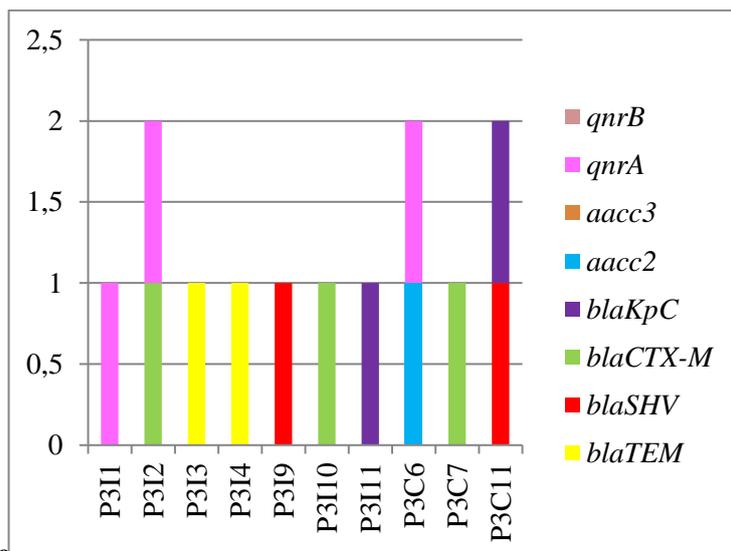
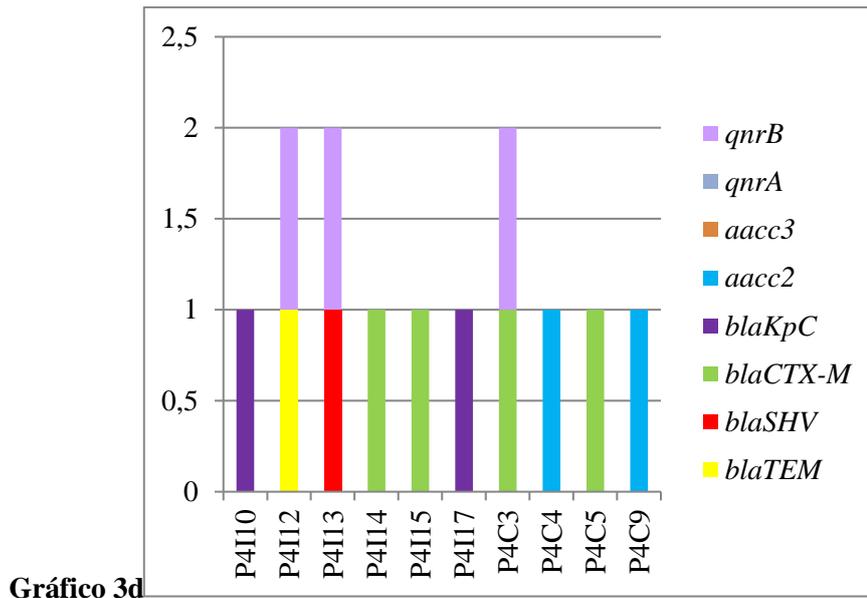


Gráfico 3c

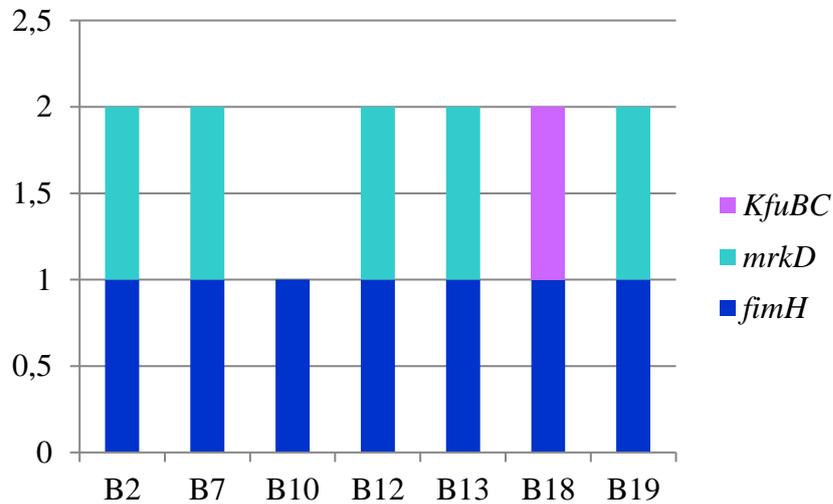


Legenda\*:ESBLs- Beta-lactamase de Espectro Estendido; EMA- Enzima Modificadora de Aminoglicosídeo; PMQR- Plasmídeo Mediando Resistência a Quinolonas.

### 3.6. Presença de mecanismos de virulência codificados por genes de virulência

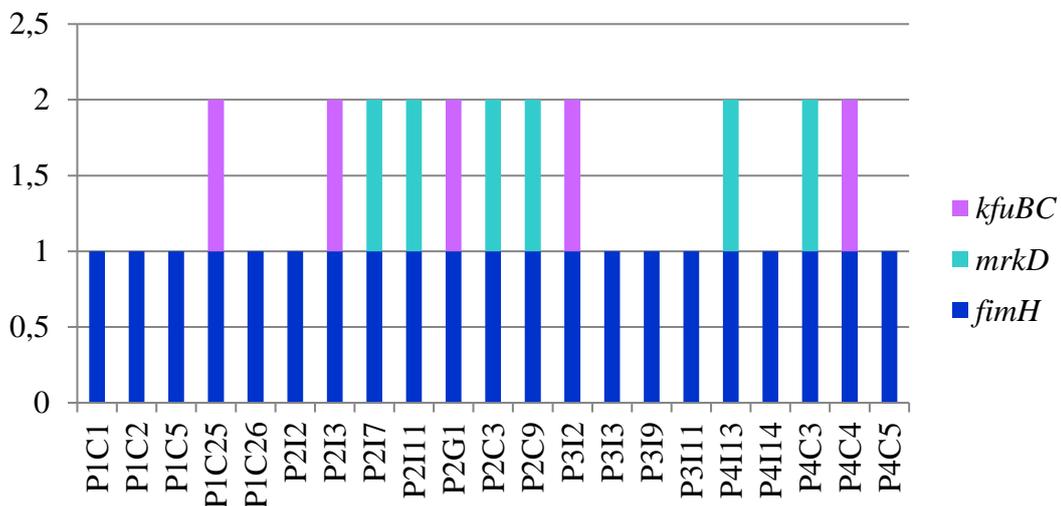
Todas as cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes infectados apresentaram o gene *fimH* (Fímbria tipo 1), relacionado à capacidade de aderência bacteriana. Com exceção das cepas B10 (secreção traqueal- CTI geral) e B18 (infecção urinária- ambulatório), todas também foram positivas para o gene *mrkD*, relacionado à presença de adesinas e produção de biofilme. Apenas a cepa B18 apresentou o gene *kfuBc*, que está diretamente ligado ao sistema de captação de ferro pela bactéria (**Gráfico 4**).

Gráfico 4 -Cepas multirresistentes de *Klebsiellapneumoniae*isoladas de pacientes infectados carreando genes virulência relacionados com a capacidade de aderência bacteriana (*fimH*), formação de biofilme (*mrkD*) e captação de ferro (*KfuBC*)



Dentre as 38 cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas do ambiente aquático, 21 (55,2%) apresentaram genes de virulência compatíveis com a capacidade de aderência, formação de biofilme e captação de ferro. Todas as 21 cepas MDR de *K. pneumoniae* apresentaram o gene *fimH*, enquanto seis (P2I7, P2I11, P2C3, P2C9; P4I13 e P4C3) foram positivas para o gene *mrkD* e cinco (P1C25; P2I3, P2G1; P3I2 e P4C4) apresentaram o gene *kfuBC* (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Cepas multirresistentes de *Klebsiellapneumoniae*isoladas de quatro pontos dos rios Joana e Maracanã carreando genes de virulência relacionados com a capacidade de aderência bacteriana (*fimH*), formação de biofilme (*mrkD*) e captação de ferro (*KfuBC*)



### 3.7. Capacidade de formação de biofilme em superfícies abióticas

Os resultados dos ensaios para avaliar a capacidade de produção de biofilme em superfície hidrofóbica (poliestireno) e hidrofílica (vidro) de 45 cepas MDR de *K. pneumoniae* estão apresentados nas tabelas 6 e 7. Todas as cepas testadas foram capazes de aderir as superfícies abióticas testadas e produzir biofilme em intensidades variadas no poliestireno e no vidro. Cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas do ambiente fluvial expressaram elevada habilidade de produção de biofilme no poliestireno (81,5%; n=31) e no vidro (94,7%; n=36), a semelhança do observado para 85,7% (n=6) das cepas isoladas de pacientes infectados, que apresentaram de capacidade de produção de biofilme tanto no poliestireno quanto no vidro.

Tabela 6 - Capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica de sete cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes infectados

Número da cepa	Sítio de isolamento	Biofilme em poliestireno	Biofilme em vidro
B2	Sangue	MA	I (+++)
B7	Sangue	FA	II (++)
B10	Sec. Traqueal	FA	III (+)
B12	Sangue	FA	I (+++)
B13	Swab de orofaringe	FA	III (+)
B18	Urina	FA	I (+++)
B19	Urina	FA	I (+++)

Legenda: FA – fortemente aderente; MA – moderadamente aderente; I (+++) – bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar – fortemente aderente; II (++) – bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro – moderadamente aderente; III (+) – bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar – fracamente aderente e IV (-) – ausência de bactérias aderidas – não aderente.

Tabela 7 - Capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica de 38 cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de ambiente fluvial

Ponto de isolamento	Número da cepa	Biofilme em poliestireno	Biofilme em vidro
Ponto 1	P1C1; P1C5	FA	II(++)
	P1C2	FA	III(+)
	P1C25	FA	I(+++)
	P1C26	MA	I(+++)
Ponto 2	P2I2; P2I3; P2I5; P2I7; P2I12; P2G2; P2G9;P2C7; P2C9	FA	I(+++)
	P2G1; P2C8	FA	II(++)
	P2C3	FA	III(+)
	P2I11	MA	I(+++)

Ponto 3	P3I2; P3I4	FA	II(++)
	P3I3; P3I10; P3C6; P3C7; P3C11	FA	I(+++)
	P3I1; P3I9; P3I11	MA	I(+++)
Ponto 4	P4I10; P4I12; P4I13; P4I14; P4C3; P4C4; P4C5; P4C9	FA	I(+++)
	P4I15 P4I17	MA	I(+++)

Legenda: FA – fortemente aderente; MA – moderadamente aderente; I (+++) – bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar – fortemente aderente; II (++) – bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro – moderadamente aderente; III (+) – bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar – fracamente aderente e IV (-) – ausência de bactérias aderidas – não aderente.

### 3.8. Perfis genotípicos das cepas MDR de *K. pneumoniae* determinados pela técnica de PFGE

Foram determinados os perfis clonais de todas as 45 cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas tanto de pacientes infectados (n=7) quanto de ambiente fluvial (n=38). Foi detectada a presença de nove perfis clonais distintos, designados pulsotipos, compreendendo, ainda, 18 subgrupos observados nos pulsotipos A (n=2), B (n=2), E (n=2), G (n=2), H (n=2) e I (n=4) (Figura 5 e Tabela 8).

O perfil clonal (pulsotipo) A apresentou dois subgrupos contendo cepas (n=2 cada) MDR de *K. pneumoniae* isoladas de ambiente fluvial: A'1 (P4I12; P4I13), isolado no ponto de junção entre os rio Joana e Maracanã e A'2 (P2C8; P2C9), isolados no ponto de coleta localizado em frente ao hospital universitário estudado.

Os pulsotipos B, incluindo os subgrupos B'1 (P3C7), B'2 (P3C6) e B'3 (P3I3, P3I9 e P3I11) e C (P3I1) foram detectados em cepas isoladas no ponto 3.

As cepas isoladas de pacientes infectados, B7 (infecção sanguínea) e B10 (secreção traqueal), foram caracterizadas como pulsotipo D.

O pulsotipo E, albergando os subgrupos E'1 (P4I14 e P4I17) e E'2 (B2 – isolada de infecção sanguínea), apresentou similaridade entre cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas de ambiente fluvial e de pacientes.

As cepas isoladas do rio Maracanã P3I4, P3I10 e P3C11 e as cepas P4I10 e P4I15, isoladas na junção dos rios Joana e Maracanã, foram apresentaram perfil clonal F, subgrupo F'1.

O pulsotipo G, incluindo os subgrupos G'1 (P2C3 e P2C7) e G'2 (P2G2 e P2G9) foram detectados em cepas isoladas no rio Joana, em frente ao hospital universitário estudado. O mesmo ocorreu com o pulsotipo H, em que os subgrupos H'1 (P1C1 e P1C5) e

H'2 (P1C2) também foram isolados no rio Joana; no entanto, as amostras de água foram coletadas antes do HUPE.

Vale ressaltar que o pulsotipo I apresentou quatro subgrupos distintos, dos quais os subgrupos I'1 (P2I7, P2I11, P2I12 e P2G1) e I'2 (P1C25, P1C26; P2I2, P2I3, P2I5 e P4C9) foram exclusivamente detectados em cepas isoladas no ambiente fluvial. Entretanto, os subgrupos I'3 (P1I2; P4C3 e P4C5; B12, B13 e B18) e I'4 (P4C4; B19) foram encontrados tanto no ambiente fluvial quanto em pacientes internados.

Figura 5 - Dendograma demonstrando os diferentes perfis clonais (pulsotipos) de 45 cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* obtidas de casos clínicos (n=7) e de diferentes pontos dos rios Joana e Maracanã (n=38), localizados na região urbana do Rio de Janeiro, Brasil

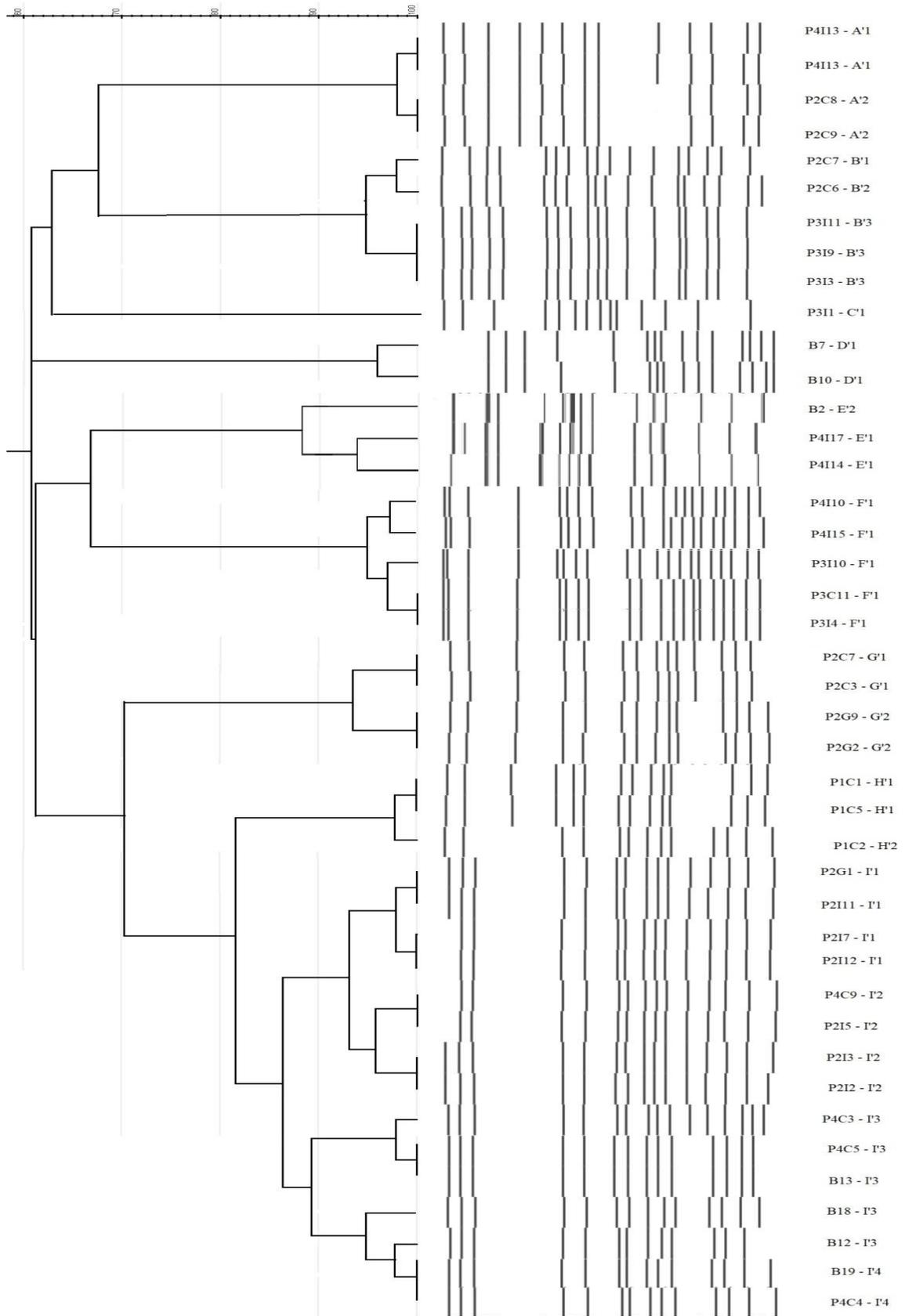


Tabela 8 - Perfis genotípicos (pulsotipos) determinados pela técnica de PFGE de 45 cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* obtidas de casos clínicos (n=7) e de diferentes pontos dos rios Joana e Maracanã (n=38), localizados na região urbana do Rio de Janeiro, Brasil.

PFGE	Subgrupo clonal	Número das amostras (n=45)	Local de isolamento**
<b>A</b>	A'1	P4I12; P4I13	Junção dos rios Joana e Maracanã
	A'2	P2C8;P2C9	Rio Joana – em frente ao HUPE
<b>B</b>	B'1	P3C7	Rio Maracanã
	B'2	P3C6	Rio Maracanã
	B'3	P3I3, P3I9 e P3I11	Rio Maracanã
<b>C</b>	C'1	P3I1	Rio Maracanã
<b>D</b>	D'1	B7 e B10	Cepas hospitalares* isoladas de sangue e secreção traqueal
<b>E</b>	E'1	P4I14 e P4I17	Junção dos rios Joana e Maracanã
	E'2	B2	Cepas hospitalares* isoladas de sangue
<b>F</b>	F'1	P3I4, P3I10, P3C11	Rio Maracanã
		P4I10, P4I15	Junção dos rios Joana e Maracanã
<b>G</b>	G'1	P2C3 e P2C7	Rio Joana – em frente ao HUPE
	G'2	P2G2 e P2G9	Rio Joana – em frente ao HUPE
<b>H</b>	H'1	P1C1 e P1C5	Rio Joana – antes do HUPE
	H'2	P1C2	Rio Joana – antes do HUPE
<b>I</b>	I'1	P2I7, P2I11, P2I12 e P2G1	Rio Joana – em frente ao HUPE
	I'2	P1C25, P1C26,	Rio Joana – antes do HUPE
		P2I2, P2I3,P2I5	Rio Joana – em frente ao HUPE
		P4C9	Junção dos rios Joana e Maracanã
	I'3	P1I2,	Rio Joana – antes do HUPE
		P4C3, P4C5,	Junção dos rios Joana e Maracanã
		B12, B13 e B18	Cepas hospitalares* isoladas de sangue, “swab” de orofaringe e urina
I'4	P4C4	Junção dos rios Joana e Maracanã	
	B19	Cepas hospitalares* isoladas de urina	

Legenda: \*Cepas hospitalares isoladas de pacientes internados no Hospital Universitário Pedro Ernesto; \*\* Vide figura 1 3.9. ***Caenorhabditis elegans* como modelo de infecção *in vivo***

Dez cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas de infecções hospitalares e de ambientes fluviais, representantes dos diferentes perfis clonais, foram analisadas quanto à capacidade de infectar e induzir a mortalidade de nematódeos *C. elegans*. Os resultados demonstraram uma variabilidade das cepas dos diferentes pulsotipos em relação ao tempo e ao número de

nematódeos mortos conforme demonstrado no gráfico 6. Nenhuma das cepas analisadas foi capaz de matar 100% dos nematódeos no período de 5 dias.

Análises estatísticas demonstram que os pulsotipos A, B, F, I (isolados no ambiente fluvial) e E (isolado de pacientes infectados) não apresentaram diferença significativa ( $p \geq 1$ ) na capacidade de causar morte no primeiro dia de infecção, em contraste com o observado para os pulsotipos H e I, provenientes de pacientes infectados e do ambiente fluvial, respectivamente. No segundo dia, foi observado que o pulsotipo H apresentou uma maior taxa de mortalidade quando comparados com perfis clonais B, E e F. O pulsotipo C, isolado de ambiente fluvial, demonstrou uma baixa taxa de letalidade desde o primeiro dia, mantendo uma linearidade até o quinto dia de infecção; contudo, apresentou maior taxa de sobrevivência no terceiro e quarto dias quando comparado com os pulsotipos H e I, isolados de pacientes infectados e do ambiente fluvial, respectivamente. No quinto dia de infecção, o pulsotipo C permaneceu tendo uma maior taxa de sobrevivência entre os clones analisados, porém, o clone I, proveniente de infecções hospitalares, apresentou um aumento significativo na taxa de mortalidade entre o segundo e o terceiro dia de infecção, resultando na maior taxa de mortalidade entre os clones de PFGE analisados.

Gráfico 6 - Efeitos da inoculação de cepas de MDR de *Klebsiella pneumoniae* oriundas pacientes infectados e do ambiente fluvial na sobrevivência do nematódeo *Caenorhabditis elegans*

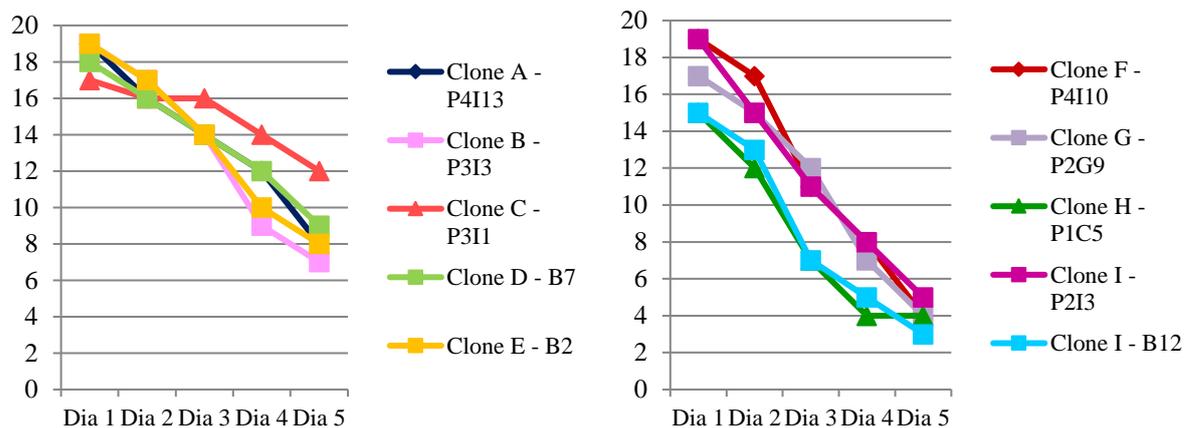


Gráfico 7 - Inibição de viabilidade de nematódeo *Caenorhabditis elegans* relacionada com cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes pulsotipos

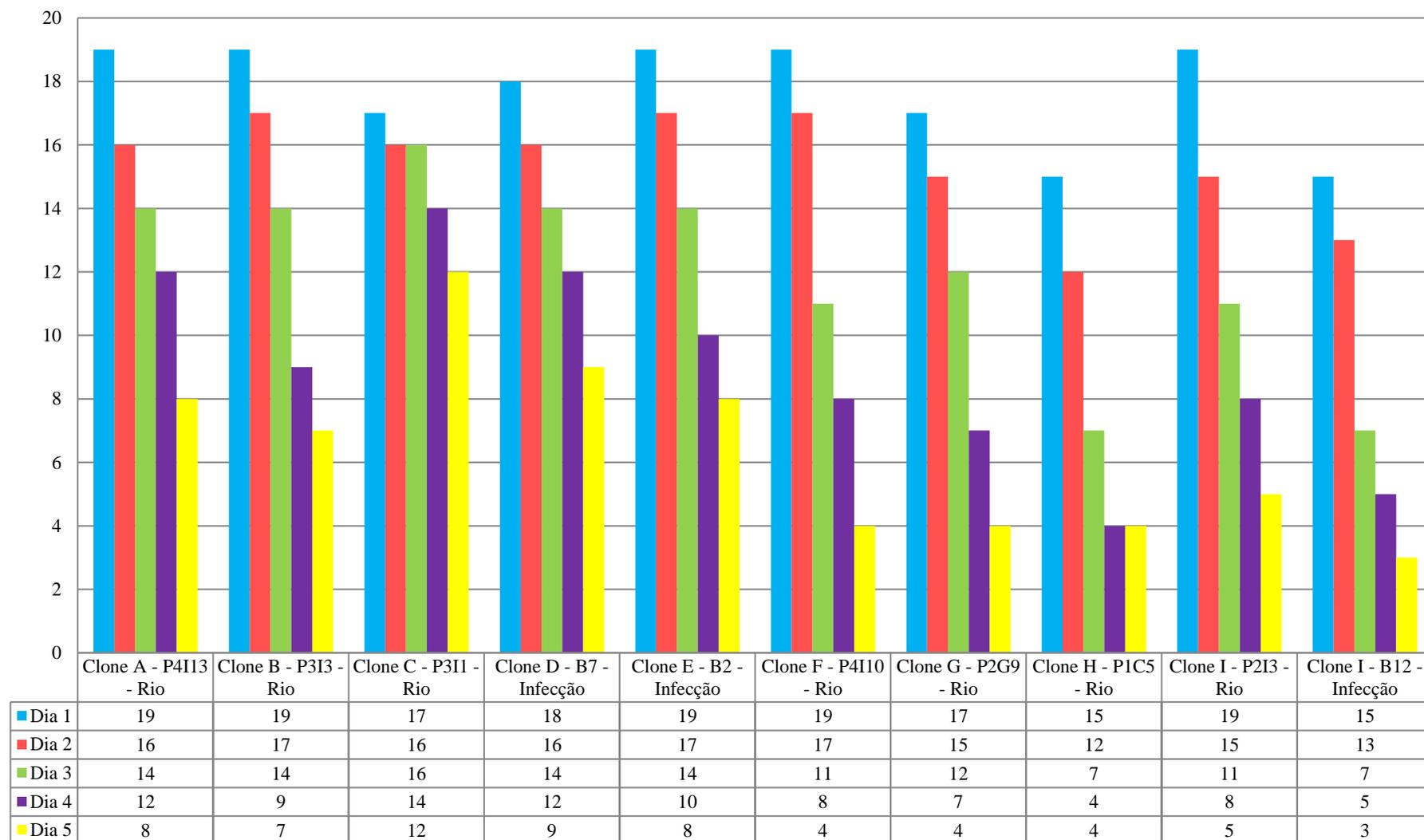
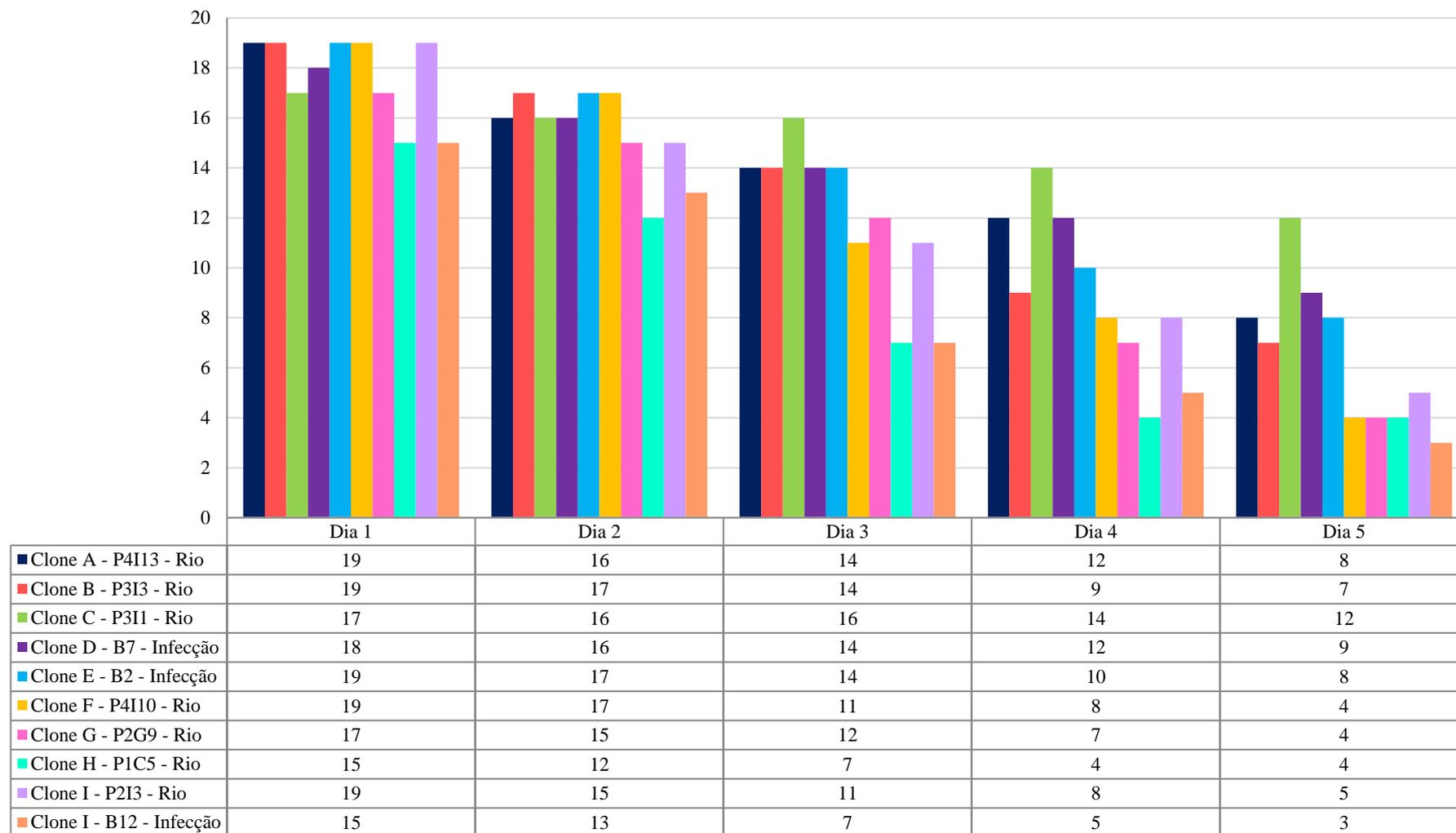


Gráfico 8 - Análise comparativa do tempo de inibição de viabilidade de nematódeo *Caenorhabditis elegans* causados por cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes pulsotipos



### 3.10. Interação bacteriana com células endoteliais humanas de linhagem CACO-2

Os resultados dos ensaios de interação bacteriana com monocamadas de células CACO-2 em diferentes tempos de incubação e concentrações bacterianas para a avaliação de capacidade de aderência, viabilidade intracelular e persistência de 10 cepas MDR de *K. pneumoniae* de diferentes pulsotipos estão demonstrados nas tabelas 9 e 10 (**Gráfico 9**).

As 10 cepas MDR de *K. pneumoniae* testadas, isoladas tanto ambiente fluvial quanto em infecções nosocomiais, dos pulsotipos A – I, foram capazes de se aderir à superfície das células endoteliais humanas, porém em diferentes níveis, independente da concentração de bactéria utilizada nos ensaios (MOI10 e MOI100) e do tempo de incubação (2h e 4h).

Os resultados dos ensaios de viabilidade intracelular demonstraram que apenas as duas cepas pertencentes ao pulsotipo I (MOI10 e MOI100), isoladas de infecções sanguíneas e do ambiente fluvial, e do pulsotipo H (MOI100), oriundos do ambiente fluvial, foram capazes de permanecer viáveis dentro da célula após 2h de incubação. Após 4h de incubação, também foram observadas bactérias viáveis internalizadas pertencentes aos pulsotipos C (MOI100), G (MOI10 e MOI100) e H (MOI10). Para as demais cepas dos pulsotipos A, B, D e F, não foi detectada viabilidade intracelular em nenhuma oportunidade.

A capacidade de persistência nas monocamadas de CACO-2 foi dependente do tempo de execução dos experimentos. Após 2h de ação do agente antimicrobiano, apenas 4% das células bacterianas (MOI100) oriundas do pulsotipo I (amostra de sangue) foram capazes de persistir na célula após 24h de incubação, enquanto os pulsotipos G, H e I também apresentaram essa habilidade após 4h de ação do agente antimicrobiano, independente das concentrações bacterianas utilizadas.

Tabela 9 - Interação de células endoteliais humanas (CACO-2) com cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes pulsotipos isoladas de pacientes infectados e ambiente fluvial

<i>Pulsotipo/ amostra bacteriana</i>	<i>Ensaio de interação com monocamadas de células de linhagem CACO-2 (2h incubação)</i>						<b>Inóculo (UFC)</b>
	<b>Aderência</b>		<b>Viabilidade intracelular</b>		<b>Persistência</b>		
	MOI10	MOI100	MOI10	MOI100	MOI10	MOI100	
A - P4I13	5,9%	48%	-	-	-	-	2x10 <sup>8</sup>
B - P3I3	7,2%	10,1%	-	-	-	-	2x10 <sup>8</sup>
C - P3I1	3,4%	25,1%	-	-	-	-	2x10 <sup>9</sup>
D - B7	26,1%	13,5%	-	-	-	-	2x10 <sup>9</sup>
E - B2	5,5%	47,5%	-	-	-	-	2x10 <sup>7</sup>
F - P4I10	15,2%	19,4%	-	-	-	-	2x10 <sup>7</sup>
G - P2G9	8,2%	40,4%	-	-	-	-	2x10 <sup>6</sup>
H - P1C5	9,2%	31,9%	-	18,2%	-	-	2x10 <sup>6</sup>
I - P2I3	28,3%	51,2%	17,5%	33,7%	-	-	2x10 <sup>6</sup>
I - B12	25,5%	32,8%	29,8%	46,1%	-	4%	2x10 <sup>6</sup>

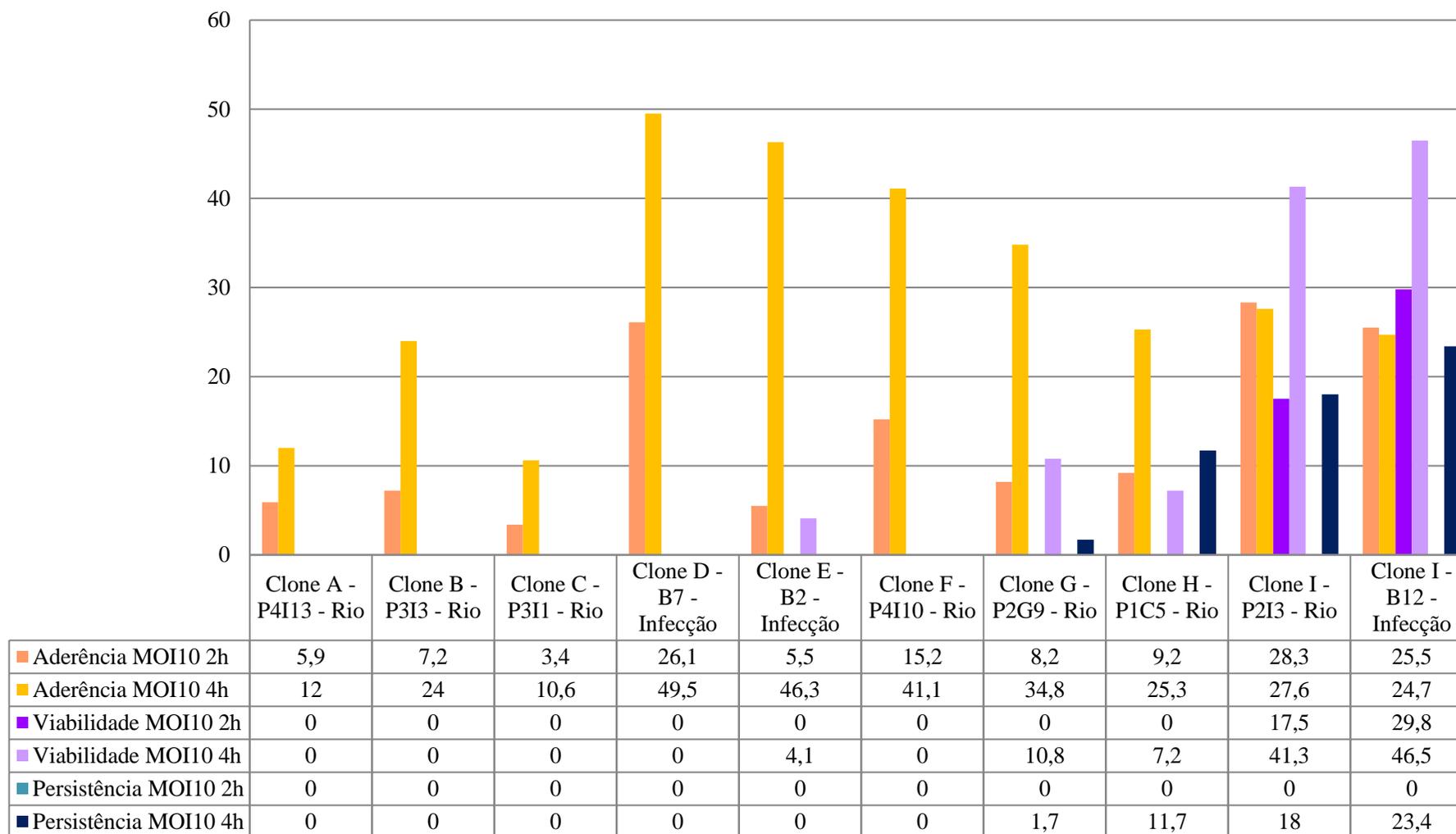
Legenda: -: não foi observado crescimento bacteriano

Tabela 10 - Interação de células endoteliais humanas (CACO-2) com cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes pulsotipos isoladas de pacientes infectados e ambiente fluvial

<i>Pulsotipo/ amostra bacteriana</i>	<i>Ensaio de interação com monocamadas de células de linhagem CACO-2 (4h incubação)</i>						<b>Inóculo (UFC)</b>
	<b>Aderência</b>		<b>Viabilidade intracelular</b>		<b>Persistência</b>		
	MOI10	MOI100	MOI10	MOI100	MOI10	MOI100	
A - P4I13	12%	20%	-	-	-	-	2x10 <sup>9</sup>
B - P3I3	24%	49%	-	-	-	-	2x10 <sup>9</sup>
C - P3I1	10,6%	47,6%	-	9%	-	-	2,1x10 <sup>9</sup>
D - B7	49,5%	49,3%	-	-	-	-	2,1x10 <sup>9</sup>
E - B2	46,3%	48,6%	4,1%	10,1%	-	-	2x10 <sup>8</sup>
F - P4I10	41,1%	42,8%	-	-	-	-	2x10 <sup>8</sup>
G - P2G9	34,8%	42,8%	10,8%	12,1%	1%	1,7%	2x10 <sup>7</sup>
H - P1C5	25,3%	34,7%	7,2%	17,1%	12%	11,7%	2x10 <sup>7</sup>
I - P2I3	27,6%	61,8%	41,3%	27,1%	16%	18%	2x10 <sup>7</sup>
I - B12	12%	20%	-	-	-	-	2x10 <sup>9</sup>

Legenda: -: não foi observado crescimento bacteriano

Gráfico 9 - Interação de células endoteliais humanas (CACO-2) com cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes pulsotipos isoladas de pacientes infectados e ambiente fluvial na concentração de MOI10 após 2h e 4h de infecção



#### 4. DISCUSSÃO

IRAS são um fator significativo relacionada à mortalidade em todo o mundo, estima-se que a cada 100 pacientes, de 4 a 20 estejam relacionados a esse tipo de infecção. Os principais microrganismos relacionados às IRAS são as espécies do grupo ESKAPE, representando uma grande ameaça à saúde pública e tornando-se cada vez mais resistentes aos agentes antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica (Rosa-Zamboni *et al.*, 2018; Zhen *et al.*, 2019). Uma das principais propriedades desse grupo é a capacidade de se adaptar às condições ambientais adversas, sendo capaz de trocar material genético com outros microrganismos por meio de transferência horizontal de genes. Na prática clínica, essa capacidade de aquisição de pode acarretar em falhas no tratamento da terapêutica e, por consequência, pode levar a um aumento da gravidade das infecções, especialmente se o perfil de resistência observado estiver relacionado com agentes antimicrobianos de primeira escolha. No ambiente comunitário, a presença de cepas bacterianas do grupo ESKAPE apresentando perfil de multirresistência em águas residuais, está relacionada com o uso de agentes antimicrobianos nas indústrias, na agricultura e na utilização incorreta para o tratamento de infecções, resultando na presença de bactérias clinicamente relevantes e resistentes em águas residuais comunitárias, clínicas e urbanas (Savin *et al.*, 2020).

Pertencente ao grupo ESKAPE, está a *K. pneumoniae*, um dos patógenos nosocomiais mais comuns do mundo. Isolados desta espécie vem sendo relatados como resistentes a quase todas as classes de agentes antimicrobianos através de mutações progressivas e aquisição de plasmídeos e integrons (Yan *et al.*, 2017). De acordo com a OMS, cepas de *K. pneumoniae* produtoras de beta-lactamase de espectro estendido e/ou resistente aos carbapenêmicos são uma ameaça à saúde pública uma vez que essa espécie apresenta mais de 50% de resistência a cefalosporinas de terceira geração em seis regiões da OMS e mais de 50% de resistência aos carbapenêmicos em duas regiões da OMS (Zhen *et al.*, 2019; Wyres, Lam, Holt, 2020). Além de sua importância como patógeno nosocomial, cepas de *K. pneumoniae* podem ser encontradas vivendo em diversos nichos ambientais, incluindo ambientes aquáticos e exibe diversidade fenotípica e genética. Entretanto, pouco se sabe sobre como essa diversidade genética está estruturada dentro da população bacteriana e a relação com a ecologia do organismo ou sua capacidade de causar diferentes tipos de infecções (Wyres, Lam, Holt, 2020).

Os agentes antimicrobianos têm sido fundamentais no tratamento e prevenção infecções, contudo, o seu uso excessivo na área de saúde, agricultura, e no meio ambiente, além da

utilização indevida, incluindo escolhas e dosagens inadequadas e baixa adesão às diretrizes de tratamento, contribuem para um aumento alarmante da resistência bacteriana em todo o mundo (Zhen *et al.*, 2019). O consumo global de agentes antimicrobianos aumentou 65% de 2000 a 2015, impulsionado principalmente por países em desenvolvimento (Ma *et al.*, 2020).

*K. pneumoniae* expressando perfis de multirresistência, incluindo resistência aos carbapenêmicos, tem sido considerada endêmica em diversos países. Infecções causadas por cepas MDR de *K. pneumoniae* estão associadas a taxas de mortalidades superiores a 40% na prática clínica (Bassetti *et al.*, 2018; Sousa, 2020). Essa resistência vem resultando em uma crescente preocupação mundial no que diz respeito à escolha de agentes antimicrobianos eficazes para o tratamento de infecções causadas por esse patógeno (Ferreira *et al.*, 2019).

No presente estudo, 41.2% foram identificadas como cepas multirresistentes de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes infectados, corroborando os achados de diversos autores que observaram não só a presença de cepas multirresistentes de *K. pneumoniae*, mas também a dificuldade de se encontrar agentes antimicrobianos capazes de tratar de forma eficaz as infecções causadas por esse patógeno (DSouza *et al.*, 2017; Bassetti *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2019). Até recentemente, cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos eram raramente encontradas em hospitais da América Latina. No Brasil, atualmente tem sido reportado cepas de *K. pneumoniae* apresentando um alto perfil de resistência a diversos grupos de agentes antimicrobianos, incluindo os de primeira escolha, como alguns beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluorquinolonas, mas também a agentes antimicrobianos de última escolha como carbapenêmicos (beta-lactâmicos mais potentes), tigeciclina e colistina (Castanheira *et al.*, 2012; Biberg *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2017; Bassetti *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2019).

A capacidade de disseminação e aquisição de genes de resistência, através de transferência horizontal, tem um papel essencial na patogênese das infecções causadas por *K. pneumoniae* (Derakhshan *et al.*, 2016). O ambiente fluvial é constantemente influenciado pelo homem, pois recebe uma grande quantidade de efluentes urbanos, hospitalares e industriais, resultando em um reservatório de bactérias resistentes a agentes antimicrobianos capazes de transferir seus genes de resistência (Sibanda *et al.*, 2015; Adelowo *et al.*, 2018). Esse ecossistema contaminado fornece condições ideais para a disseminação de cepas bacterianas resistentes a diferentes agentes antimicrobianos, além de ser um local propício para a troca de material genético, resultando no desenvolvimento de patógenos humanos com novos mecanismos de resistência (Mondal *et al.*, 2018).

O uso indevido de agentes antimicrobianos e, conseqüentemente, a escalada da resistência bacteriana, criou desafios sem precedentes para a humanidade. Estudos demonstram

que o consumo global de agentes antimicrobianos aumentou 65% entre os anos 2000 e 2015, principalmente em países em desenvolvimento. O ambiente hospitalar apresenta uma oportunidade única para as cepas bacterianas interagirem, proliferarem e infectar populações vulneráveis, em contra partida, o ambiente aquático age como um reservatório de potenciais patógenos nosocomiais onde há prevalência de cepas multirresistentes (resistentes a  $\geq 3$  classes de agentes antimicrobianos) (Gordon *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2020) . No presente estudo, foi documentada a disseminação de cepas de *K. pneumoniae* no ambiente fluvial expressando perfil de resistência a diversos agentes antimicrobianos. Todas as 38 amostras de *K. pneumoniae*, isoladas de diferentes pontos de dois rios urbanos – Joana e Maracanã, apresentaram resistência a três ou mais grupos de antimicrobianos de interesse, incluindo os beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, fluorquinolonas e carbapenêmicos.

ESBL são enzimas bacterianas que conferem resistência a diversas classes de agentes antimicrobianos, incluindo cefalosporinas de terceira e quarta geração. O surgimento de cepas multirresistentes de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL representam uma ameaça séria à saúde pública global (Caneiras *et al.*, 2019). *K. pneumoniae* pode apresentar capacidade de produzir e adquirir ESBLs tanto no ambiente aquático quanto no hospitalar (Mondal *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2019). Foi possível observar que 71,4% das amostras de pacientes infectados e 52,6% das cepas oriundas do ambiente fluvial apresentaram genes de resistência compatíveis com ESBL: *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* e *bla<sub>SHV</sub>*. Corroborando os resultados obtidos no presente estudo, diversos autores sugerem que TEM (Temoniera), SHV (variável sulfidríla) e CTX-M (cefotaxima-beta lactamase) são os principais grupos genéticos de ESBL encontrados mundialmente e indicam uma predominância dos genes *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* e *bla<sub>SHV</sub>* no ambiente hospitalar e comunitário (Paterson, Bonomo, 2005; Monteiro *et al.*, 2009; Seki *et al.*, 2011; Fehlberg *et al.*, 2012; Mondal *et al.*, 2018).

Globalmente, CTX-M aparece como o mais comum tipo de ESBL detectado e sua ocorrência supera a presença de SHV e TEM na maioria dos locais (Jorgensen *et al.*, 2010; Bora *et al.*, 2014). Embora nossa análise por PCR tenha revelado que os genes *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>CTX-M</sub>* se equiparam no ambiente hospitalar, no ambiente aquático houve uma predominância do gene *bla<sub>CTX-M</sub>*, seguido por *bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>TEM</sub>*.

Os carbapenêmicos são uma classe de agentes antimicrobianos beta-lactâmicos com ampla atividade antibacteriana, frequentemente utilizados para tratar infecções causadas por cepas resistentes a cefalosporinas de terceira e quarta geração, capazes de produzir beta-lactamase de espectro estendido – ESBL. *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos apresentam sérios desafios no tratamento de infecções tanto comunitárias quanto hospitalar,

devido, principalmente a presença de plasmídeos carregando o gene *bla<sub>KpC</sub>*, facilitando a transmissão horizontal desses genes. Interessantemente, em nossos estudos, 97,4% das cepas ambientais apresentaram resistência aos carbapenêmicos utilizados na prática clínica, em contraste ao observado em estudos previamente realizados em outros rios urbanos da cidade do Rio de Janeiro, que também documentaram a presença de cepas multirresistentes de *K. pneumoniae* no ambiente fluvial, porém desprovidas da expressão de resistência aos carbapenêmicos (Gonçalves *et al.*, 2019).

Desde a sua descrição inicial, em 2001, a presença do gene *bla<sub>KpC</sub>* vem se espalhando rapidamente nos Estados Unidos. Relatórios semelhantes foram descritos em diversos outros países da Europa e América Latina, incluindo Brasil. Até o presente momento, o gene *bla<sub>KpC</sub>* tem sido considerado o principal determinante da resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae*, contribuindo para a disseminação mundial dessa espécie tanto no âmbito hospitalar quanto no comunitário (Chen *et al.*, 2011; Nordmann *et al.*, 2011). Em nossos estudos, a presença de tal gene se restringiu às amostras do ambiente aquático (34,2%), estando de acordo com investigações anteriores, que sugerem a ampla disseminação de amostras produtoras de KpC em diversas regiões do Brasil (Castanheira *et al.*, 2012; Biberg *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2017). Entretanto, as cepas MDR de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos testados, isoladas de paciente infectados, não apresentaram o gene *bla<sub>KpC</sub>*. Adicionalmente, tanto para as cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes infectados quanto para as cepas isoladas de ambiente fluvial, não foi detectada a presença de nenhum outro gene relacionado a resistência a carbapenemase, diferentemente de outros estudos, que detectaram primordialmente a co-produção do gene *bla<sub>OXA</sub>* associado ao gene *bla<sub>KpC</sub>* (Fehlberg *et al.*, 2012; Flores *et al.*; 2016). Trabalhos anteriores sugeriram que os genes *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>* associados a produção de carbapenemase em *K. pneumoniae* não são comumente encontrados em cepas isoladas de ambientes aquáticos (Lascols *et al.*, 2012). A co-produção de *bla<sub>KpC</sub>* com genes relacionados a ESBL também foi observada em algumas cepas fluviais de *K. pneumoniae*, corroborando outros estudos e sugerindo que a alta resistência a agentes antimicrobianos pode estar relacionada à associação de genes (Ferreira *et al.*, 2019).

Os aminoglicosídeos são utilizados em tratamentos de infecções bacterianas potencialmente fatais, entretanto, ao longo dos anos, mecanismos de resistência vem sendo adquiridos, sendo as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) as mais prevalentes. Atualmente vem sendo utilizado a plazomicina, um aminoglicosídeo de última geração, desenvolvido para superar os mecanismos mais comuns de resistência para o tratamento de pacientes com infecções graves causadas por cepas bacterianas multirresistentes produtoras de

ESBL e carbapenemase. A resistência a aminoglicosídeos em amostras de *K. pneumoniae* é predominantemente causada pela produção EMAs, especialmente a acetiltransferase (AAC). Notavelmente, o fenótipo de resistência aos aminoglicosídeos nem sempre está relacionado com a presença de genes de resistência relacionados a AME (Galani *et al.*, 2019). O presente estudo demonstrou que quase a totalidade das cepas isoladas tanto de pacientes infectados (85,7%) quanto dos ambientes fluviais (94,7%) apresentou resistência a pelo menos um dos aminoglicosídeos testados. Entretanto, verificou-se que somente metade das cepas isoladas no ambiente hospitalar e 22,2% das cepas ambientais apresentaram genes de resistência associados a EMAs, diferente dos dados observados em estudos prévios realizados no Rio de Janeiro (Gonçalves *et al.*, 2019).

PMQR desempenha um papel significativo na resistência as fluoroquinolonas devido ao seu alto potencial de disseminação entre as enterobactérias. Atualmente, três tipos de genes PMQR foram identificados, incluindo o gene *qnr*, responsável por aumentar a resistência a agentes antimicrobianos devido à sua presença em elementos genéticos móveis. Além da resistência às fluorquinolonas, o PMQR pode ser igualmente eficaz na resistência a outros agentes antimicrobianos, especialmente beta-lactâmicos e aminoglicosídeos através de mecanismos adicionais de bombas de efluxo incluindo, *QepA*, *OqxAB* e uma acetiltransferase de aminoglicosídeo conhecida como *aac(6')-Ib-cr*, que causa suscetibilidade reduzida contra ciprofloxacina (Scavuzzi *et al.*, 2019; Vaziri *et al.*, 2020).

Dentre as cepas MDR de *K. pneumoniae*, todas aquelas isoladas de pacientes infectados e 78,9% das cepas provenientes do ambiente fluvial apresentaram resistência às fluorquinolonas. Houve predominância do gene *qnrA* tanto nas cepas isoladas de pacientes infectados quanto do ambiente fluvial, seguido por *qnrB* e *qepA*. Esses dados vão de encontro aos observados por diversos autores, uma vez que o gene *qnrA* praticamente não é identificado em cepas de *K. pneumoniae*. Entretanto, cepas albergando os genes *qnrB* e *qepA* são frequentemente encontradas no ambiente hospitalar (Hamed *et al.*, 2018; Kotb *et al.*, 2019; Khairy *et al.*, 2019). Embora o gene *aac(6')*, frequentemente associado à resistência a amicacina e tobramicina seja, provavelmente, a AAC mais relevante para as enterobactérias, pois vem sendo associado à resistência aos beta-lactâmicos e fluoroquinolonas (Cirit *et al.*, 2019), em nossos estudos, não houve detecção do gene *aacC(6')-Ib-cr*, responsável por reduzir a atividade de norfloxacina e ciprofloxacina, porém esse gene vem sendo amplamente encontrado em amostras de *K. pneumoniae* tanto no ambiente hospitalar quanto no ambiente comunitário (Eftekhar, Seyedpour, 2015; Kotb *et al.*, 2019; Khairy *et al.*, 2019).

*K. pneumoniae* é agente etiológico de diversos tipos de infecções encontradas tanto na comunidade quanto no ambiente hospitalar. Além de diferentes mecanismos de resistência, a patogenicidade de isolados de *K. pneumoniae* pode estar associada com a presença de diversos fatores de virulência, incluindo a produção de cápsulas polissacarídicas, presença de fimbrias e capacidade de captação de ferro (Remya *et al.*, 2019). No presente estudo, além de ter sido demonstrada a disseminação de cepas MDR de *K. pneumoniae* em ambiente fluvial, também foi observado que 57,8% das cepas isoladas apresentaram pelo menos um gene de virulência. Adicionalmente, todas as cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes infectados também apresentaram genes de virulência.

Estudos sugerem que fatores de virulência, incluindo a capacidade de captação de ferro (*KfuBc*) e produção de fimbriae tipo 1 (*fimH*) e tipo 3 (*mrkD*) são considerados ubíquos, podendo estar disseminados tanto no ambiente aquático quanto no ambiente hospitalar desempenhando um papel significativo na patogenicidade de cepas de *K. pneumoniae* (Marques *et al.*, 2018; Remya *et al.*, 2019; Mishra *et al.*, 2020). Os resultados do presente estudo demonstraram que cepas MDR de *K. pneumoniae*, isoladas tanto do ambiente fluvial quanto em pacientes infectados, apresentaram o gene *fimH* isolado ou associado aos genes *mrkD* e *KfuBc*. Interessantemente, as cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas de infecções urinárias, respiratórias e sanguíneas apresentaram genes que codificam para as fimbrias tipo 1 e tipo 3, corroborando os achados de outros estudos (Schroll *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2019; Hamam *et al.*, 2019). Ambos os tipos 1 e 3 auxiliam nos mecanismos de aderência bacteriana e de formação de biofilme; entretanto, a fímbria tipo 1 está mais relacionada a aderência celular, enquanto a fímbria tipo 3 é mais relacionada com a capacidade de formação de biofilme (Schroll *et al.*, 2010).

Estudos afirmam que o gene *KfuBc* é amplamente relacionado com a absorção de ferro férrico, auxiliando na formação de cápsulas de hipermucoviscosidade e na invasão bacteriana em células do hospedeiro (Remya *et al.*, 2019). Embora em menor quantidade, a presença desse gene foi observada em 27% das amostras de *K. pneumoniae*, principalmente relacionados a infecções urinárias, sanguíneas e respiratórias (Schroll *et al.*, 2010). Nossos resultados demonstraram a presença do gene *KfuBc* em uma cepa isolada de infecções no trato urinário e em quatro cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas de ambiente fluvial.

A análise da capacidade de formação de biofilme das cepas MDR de *K. pneumoniae* demonstrou heterogeneidade quanto à presença de genes de resistência, virulência e os perfis clonais. As cepas multirresistentes de *K. pneumoniae* que apresentaram genes de virulência relacionados com a capacidade de formação de biofilme (*fimH* – fímbria tipo 1 e *mrkD* – fímbria

tipo 3) foram consideradas fortemente produtoras de biofilme. A relação entre genes de virulência e formação de biofilme é corroborada por diversos autores que, inclusive, destacam o perfil de multirresistência das amostras de *K. pneumoniae* como fator determinante para a capacidade de formação de biofilme. A formação de biofilme geralmente está associada à contaminação de dispositivos médicos e é constantemente relacionada com um aumento na dificuldade de tratamento de infecções, incluindo do trato urinário e pneumonia (Surgers *et al.*, 2018; Cusumano *et al.*, 2019).

Sendo assim, o acúmulo de genes de virulência junto com genes de resistência pode facilitar a infecção e limitar as opções terapêuticas. Diferentes estudos reportaram clones apresentando perfis de resistência a diversos grupos de agentes antimicrobianos e carreando fatores de virulência devido à sua capacidade de disseminação e sobrevivência (Willems *et al.*, 2011; Woodford, Turton, Livermore, 2011; Beceiro, Tomás, Bou, 2013).

A análise da diversidade genética bacteriana é essencial para inferir reservatórios e mecanismos de transmissão. Investigações previamente realizadas indicaram que a diversidade genética influencia a incidência mundial de casos de infecções causadas por *K. pneumoniae*. Nos Estados Unidos, metade das infecções causadas por bactérias Gram-negativas são relacionadas com *K. pneumoniae*. No Brasil, essa incidência é semelhante (52%), mas no Peru é de 21%, havendo evidências de disseminação clonal (Justo-da-Silva *et al.*, 2019). No presente estudo, as cepas MDR de *K. pneumoniae* isolados tanto de pacientes infectados quanto de ambiente fluvial exibiram perfis clonais distintos, possuindo a capacidade de formação de biofilme em superfície abióticas em diferentes níveis, além de apresentarem heterogeneidade quanto à presença de genes de resistência e de virulência (**Anexo 1**).

Dois pulsotipos albergaram cepas hospitalares e ambientais, demonstrando similaridade entre amostras de *K. pneumoniae* provenientes de infecções sanguínea, urinária e respiratória com cepas provenientes do ambiente aquático próximo ao hospital. Apesar de *K. pneumoniae* ser ubiqüitária e amplamente estudada no âmbito hospitalar, pouco se sabe sobre a relação de clonalidade entre cepas provenientes de pacientes infectados com outros ambientes onde essa espécie é encontrada. Alguns estudos demonstraram que amostras ambientais apresentaram similaridade em 8% dos casos quando comparado com o perfil clonal de *K. pneumoniae* em pacientes infectados (Wyres, Lam, Holt, 2020). Os dados sugerem que cepas MDR de *K. pneumoniae* podem estar sendo disseminadas do ambiente hospitalar para a rede fluvial. Estudos adicionais estão sendo desenvolvidos em nosso laboratório de pesquisa.

A partir da identificação dos diferentes grupos clonais, foi possível analisar o perfil de virulência utilizando o nematódeo *C. elegans* como modelo *in vivo*. Todos os clones

apresentaram redução da viabilidade dos nematódeos em intensidades variadas, porém nenhuma das cepas MDR de *K. pneumoniae* foi capaz de matar todos os nematódeos analisados. Nossos resultados corroboram achados de diversos autores, que, além de indicarem o uso dos nematódeos como modelo atual e necessário na análise de virulência bacteriana *in vivo*, constataram que cepas MDR de *K. pneumoniae* provenientes de diversos ambientes apresentaram um alto grau de letalidade de *C. elegans* (Bengoechea, Pessoa, 2019; Mir, Balamurugan., 2019; Yang *et al.*, 2020). Esses resultados foram observados tanto para as cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas no ambiente fluvial quanto para as cepas isoladas de casos clínicos, dos diferentes pulsotipos. Interessantemente, altas taxas de virulência foram observadas em cepas sensíveis isoladas de quadro de infecção urinária.

A partir da análise da capacidade de virulência dos pulsotipos utilizando o modelo experimental *C. elegans*, também foi analisada a capacidade de aderência, invasão e viabilidade intracelular após 24 horas na presença de agente antimicrobiano. Foi possível observar que todos os pulsotipos analisados apresentaram capacidade de aderência à célula epitelial CACO-2. Essas células são uma das linhagens mais estudadas, pois compartilham características morfológicas e funcionais com células intestinais *in vitro*, além de serem amplamente utilizadas como modelo de estudo para analisar a capacidade de adesão e internalização de patógenos (Hao, Lee., 2004; Kauffman *et al.*, 2013).

Todos os pulsotipos apresentaram capacidade de adesão celular, porém, das 10 cepas analisadas, 30% (n=3) foram capazes de internalizar após 2 horas de interação, enquanto 60% (n=6) foram capazes de internalizar após 4 horas de interação. Após 4 horas de interação, também foi possível verificar que as amostras de *K. pneumoniae* foram capazes de se manter viáveis após o uso de gentamicina no período de 24h. A capacidade de *K. pneumoniae* em sobreviver sob condições gastrointestinais simuladas, aliada à capacidade de formar biofilme forte, contribui para a capacidade de sobrevivência dessa espécie em condições hostis (Vuotto *et al.*, 2014).

Diversos autores afirmam que antes de fazer contato com o epitélio intestinal, *K. pneumoniae* deve superar uma série de defesas inatas do hospedeiro, sendo a barreira protetora de muco o principal obstáculo, pois está relacionado com os primeiros estágios do processo de colonização. A capacidade de persistência intracelular pode ser um fator crucial para a disseminação da infecção em outros órgãos e tecidos e, conseqüentemente, pode aumentar a capacidade de causar infecções extraintestinais e sepse (Maroncle *et al.*, 2002; Ferraretto *et al.*, 2007; Kauffman *et al.*, 2013).

A presença de cepas isoladas no ambiente fluvial com características semelhantes a cepas isoladas de pacientes infectados, apesar de pouco estudada, é de grande preocupação, devido, principalmente a sua alta taxa de resistência e virulência, podendo vir a causar infecções de difícil tratamento no ambiente comunitário. Deste modo, a alta incidência de isolados de *K. pneumoniae* de diferentes pulsotipos, capazes aderir e internalizar em células epiteliais humanas tanto no ambiente hospitalar quanto comunitário, além da capacidade de produção de biofilme em superfícies abióticas diversas, deve ser considerado uma ameaça à saúde pública, uma vez que infecções relacionadas a esses patógenos estão comumente ligadas ao consumo de água, alimentos e fômites contaminados

## CONCLUSÃO

Deste modo, no presente estudo, foram obtidas diversas cepas de *K. pneumoniae* tanto do ambiente hospitalar quanto do ambiente fluvial da região metropolitana do Rio de Janeiro.

Todas as cepas isoladas de pacientes infectados e de diferentes pontos da rede fluvial expressaram resistência heterogênea aos 25 agentes antimicrobianos testados, tendo sido a maioria classificada como multirresistente independente da proximidade do ambiente hospitalar. A maioria das cepas MDR oriundas do ambiente fluvial apresentou genes de resistência relacionados com presença de ESBLs, EMAs, PMQRs e carbapenamases.

Para a maioria das cepas MDR isoladas tanto do ambiente fluvial quanto do hospitalar foi observada correlação entre a presença dos genes de resistência e de virulência com as propriedades adesivas do patógeno e a habilidade de formação de biofilme em superfícies abióticas.

As cepas MDR de *K. pneumoniae* expressaram elevada habilidade de formação de biofilme em superfícies abióticas de natureza hidrofílica (vidro) e hidrofóbica (poliestireno) e heterogeneidade na presença dos genes relacionados com a formação de biofilme e captação de ferro, exceto o gene relacionado com a capacidade de produção de fimbria tipo I (*fimH*).

Os ensaios de PFGE revelaram uma heterogeneidade de perfis genéticos além da existência de cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas do ambiente hospitalar e fluvial relacionados geneticamente que expressaram potencial de virulência para o nematódeo *C. elegans* além de serem capaz de aderir, sobreviver e persistir em células epiteliais humanas de linhagem CACO-2 em intensidades variadas.

Deste modo, é motivo de preocupação a presença de cepas MDR de *K. pneumoniae* isoladas no ambiente fluvial com características semelhantes as cepas previamente identificadas como patógenos nosocomiais, devido, principalmente ao seu elevado grau de resistência e potencial de virulência, podendo vir a causar infecções de difícil tratamento no ambiente comunitário, além de poder ser novamente transferida para o ambiente hospitalar.

A alta incidência de clones MDR de *K. pneumoniae* isoladas no ambiente hospitalar e comunitário, capazes de interagir com células epiteliais humanas e de produzirem biofilme em superfícies abióticas diversas, incluindo dispositivos médicos invasivos, é considerado uma ameaça à saúde pública e deve ser investigado mais detalhadamente. Adicionalmente, as infecções relacionadas a esses patógenos estão comumente ligadas ao consumo de água, alimentos e fômites contaminados. Finalmente, a contaminação de animais de companhia,

como cães e gatos, por cepas MDR de *K. pneumoniae* presentes no meio ambiente e transmissão para os humanos também precisam ser mais estudados.

## REFERÊNCIAS

- Adelowo, O. O.; Caucci, S.; Banjo, O. A.; Nnanna, O. C.; Awotipe, E. O.; Peters F.B.; Fagade O.E.; Berendonk, T.U. Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-producing bacteria isolated from hospital wastewaters, rivers and aquaculture sources in Nigeria. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 3, p. 2744–2755, 2018.
- Alcántar-Curiel, M. D.; Blackburn, D.; Saldana, Z.; Gayosso-Vásquez, C.; Iovine, N. M.; De La Cruz, M. A.; Girón, J. A. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. **Virulence**, v. 4, p. 129-138, 2013.
- Alnajar, S., Gupta, R. S. Phylogenomics and comparative genomic studies delineate six clades within the family *Enterobacteriaceae* and support the reclassification of several polyphyletic members of the family. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 54, p. 108-127, 2017.
- Antunes, C. A.; Clark, L.; Wanuske, M. T.; Hacker, E.; Ott, L.; Simpson-Louredo, L.; Luna, M. G.; Hirata, Jr. R.; Mattos-Guaraldi, A. L.; Hodgkin, J.; Burkovski, A. *Caenorhabditis elegans* star formation and negative chemotaxis induced by infection with corynebacteria. **Microbiology**, v. 162, p. 84-93, 2015b.
- Antunes, C.A., Santos, L.S., Hacker, E., Köhler, S., Bösl, K., Ott, L., de Luna, Md., Hirata, R.Jr., Azevedo, V.A., Mattos-Guaraldi, A.L., e Burkovski, A. Characterization of DIP0733, a multi-functional virulence factor of *Corynebacterium diphtheriae*. **Microbiology** v. 161, p. 639-647, 2015a.
- AGÊNCIA Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Nota Técnica nº 01/2013. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/Microsoft+Word+-+NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013\(1\).pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/Microsoft+Word+-+NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013(1).pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 10 jun. 2018.
- ANVISA. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015.
- Araújo, C. F.; Silva, D. M.; Carneiro, M. T.; Ribeiro, S.; Fontana-Maurell, M.; Alvarez, P.; Asensi, M. D.; Zahner, V.; Carvalho-Assef, A. P. DetecctionofCarbapenemase Genes in AquaticEnvironments in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 7, p.4380-4383, 2016.
- Balaban, N. Q.; Merrin, J.; Chait, R.; Leibler, S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. **Science**, v. 10, n. 305, p. 1622–1625, 2004.
- Balestrino, D.; Chigo, J. M.; Charbonnel, N.; Haagensen, J. A.; Forestier, C. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* *in vitro* biofilme reveals dual roles for surface exopolysaccharides. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 685-701, 2008.

- Balla, K. M.; Troemel, E. R. *Caenorhabditis elegans* as a model for intracellular pathogen infection. **Cellular microbiology**, v.15, p. 1313-1322, 2013.
- Barati, A.; Ghaderpour, A.; Chew, L. L.; Bong, C. W.; Thong, K. L.; Chong, V. C.; Chai, L. C. Isolation and Characterization of Aquatic-Borne *Klebsiella pneumoniae* from Tropical Estuaries in Malaysia. **Environmental Research and Public Health**, n. 13, v. 426, 2016.
- Bassetti, M. Righi, E. Carnelutti, A. Graziano, E.; Russa, A. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: challenges for treatment, prevention and infection control. **Expert Review of Anti-Infective therapy**, 2018.
- Bauernfeind, A.; Grimm, H.; Schweighart, S. A new plasmidiccefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection**, v. 18, n. 5, p. 294–298, 1990.
- Beceiro, A.; Tomás, M.; Bou, G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in bacterial world? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 185, 2013.
- Bengochea, J. A.; Pessoa, J. S. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, p. 123-144, 2019.
- Bialek-Davenet, S.; Criscuolo, A.; Ailloud, F.; Passet, V.; Jones, L.; Delannoy-Vieillard, A. S.; et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. **Emerging Infectious Disease**, v. 20, p. 1812-1820, 2014.
- Biberg, C. A.; Rodrigues, A. C.; do Carmo, S. F.; Chaves, C. E. Gales, A. C.; Chang, M. R. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in the Midwestern region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 501-504, 2015.
- Bigger, J. W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. **The Lancet**, v. 244, n. 6320, p.497–500, 1944.
- Blin, C.; Passet, V.; Touchon, M.; Rocha, E. P. C.; Brisse, S. Metabolic diversity of the emerging pathogenic lineages of *Klebsiella pneumoniae*. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 1881-1898.
- Boddicker, J. D.; Anderson, R. A.; Jagnow, J.; Clegg, S. Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 4590-4597, 2006.
- Bono, M.; Bargmann, C.; Natural Variation in a Neuropeptide Y Receptor Homolog Modifies Social Behavior and Food Response in *C. elegans*. **The Journal Cell**, v. 94, n. 5, p. 679-689, 1998.
- Brejijeh, Z.; Jubeh, B.; Karaman, R. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. **Molecules**, v. 25, 2020
- Brisse, S.;Fevre, C.;Passet, V.;Issenhuth-Jeanjean, S.;Tournebize, R.;Diancourt, L.;Grimont, P. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. **PLoS One**, v. 4, n.3, p. 4:e4982, 2009.

- Browning, D.F., Wells, T.J., França, F.L., Morris, F.C., Sevastsyanovich, Y.R., Bryant, J.A., Johnson, M.D., Lund, P.A., Cunningham, A. F; Hobman, J. L.; May, R. C.; Webber, M. A.; Henderson, I. R. Laboratory adapted *Escherichia coli* K-12 becomes a pathogen of *Caenorhabditis elegans* upon restoration of O antigen biosynthesis. **Molecular Microbiology**, v.87, n. 5, p. 939–950, 2013.
- Cabral, A. B.; Maciel, M. A. V.; Barros, J F.; Antunes, M. M.; Castro, C. M. M. B. Lopes, A. C. S. Clonal spread and accumulation of beta-lactam resistance determinants in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* complex isolates from infection and colonization in patients at a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 1, 2017
- Calbo, E.; Garaum J. The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: the CTX-M-15 type consolidation. **Future Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1063-1075, 2015.
- Calbo, E.; Freixas, N.; Xercavins, M.; Riera, M.; Nicolás, C.; Monistrol, O.; Solé, M.; Sala, M. R.; Vila, J.; Garau, J. Foodborne Nosocomial Outbreak of SHV1 and CTX-M-15–producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and Control. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 6, p. 743-749, 2011.
- Caneiras, C.; Lito, L.; Melo-Cristino, J.; Duarte, A. Community and hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infections in Portugal: virulence and antibiotic resistance. **Microorganisms**, v. 7, n. 138, 2019
- Canton, R.; Coque, T. M. The CTX-M beta-lactamase pandemic. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 466-475, 2006.
- Castanheira, M.; Costello, A. J.; Deshpande, L. M.; Jones, R. N. Expansion of clonal complex 258 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin America hospitals: report of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 1668-1669, 2012.
- Castonguay, M. H.; Van Der Schaaf, S.; Koester, W.; Krooneman, J.; Van Der Meer, W.; Harmsen, H.; Landini, P. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. **Research in Microbiology**, v.157, n. 5, p. 471-478, 2006.
- CDC. Guidance for Control of Infections with Carbapenem-resistant or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in acute care facilities. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 58, n. 10, p. 256-260, 2009.
- Chagas, T. P.; Seki, L. M.; Silva, D. M.; Asensi, M. D. Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. **The Journal of Hospital Infection**, v. 77, n. 3, 2011.
- Chen, L.; Mediavilla, J. R.; Endimiani, A.; Rosenthal, M. E.; Zhao, Y.; Bonomo, R. A.; Kreiswirth, B. N. Multiplex Real-time PCR assay for detection and classification of

*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases gene (*bla<sub>KPC</sub>*) variants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 579-585, 2011.

Chmelnitsky, I.; Hermesh, O.; Navon-Venezia, S.; Strahilevitz, J.; Carmeli, Y. Detection of *aac(69)-Ib-cr* in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tel Aviv, Israel. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 4, p. 718–722, 2009.

Choby, J. E.; Howard-Anderson J.; Weiss, D. S. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives. **Journal of Internal Medicine**, v. 287, p. 283-300, 2020.

Chong, Y.; Shimoda, S.; Shimono, N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Infection, Genetics and Evolution**, 2018.

Chun-Ru, H.; I-Wei, C.; Pei-Fang, H.; Tzu-Lung, L.; Pei-Yin, L.; Chen-Hsiu, H.; Kun-Tzu, L.; Jin-Town, W. A Novel Role for the *Klebsiella pneumoniae* Sap (Sensitivity to Antimicrobial Peptides) Transporter in Intestinal Cell Interactions, Innate Immune Responses, Liver Abscess, and Virulence. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 219, n. 8, p. 1294–1306, 2019.

Chung The, H.; Karkey, A.; Thanh, D. P.; Boinett, C. J.; Cain, A. K.; Ellington, M.; Baker, K. S.; Dongol, S.; Thompson, C.; Harris, S. R.; Jombart, T.; Phoung, T. L. T.; Hoang, N. T. D.; Thanh, T. H.; Shretha, S.; Joshi, S.; Basnyat, B.; Thwaites, G.; Thomson, N. R.; Rabaa, M.; Baker, S. A high-resolution genomic analysis of multidrug-resistant hospital outbreaks of *Klebsiella pneumoniae*. **EMBO Molecular Medicine**, v. 7, p. 227-239, 2015.

Cirit, O. S.; Fernandez-Martinez, M.; Yayla, B.; Martinez-Martinez, L. Aminoglycoside resistance determinants in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Turkish and Syrian patients. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 66, n. 3, p. 327-335, 2019.

CLSI- Clinical Laboratories Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests. **Approved Standard CLSI Document M2**. Waine, PA, EUA: Clinical Laboratories Standards Institute, 2014.

CLSI- Clinical Laboratories Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests. **Approved Standard CLSI Document M2**. Waine, PA, EUA: Clinical Laboratories Standards Institute, 2018.

Compain, F.; Babosan, A.; Brisse, S.; Genel, N.; Audo, J.; Ailloud, F.; Kassis-Chikhani, N.; Arlet, G.; Decré, D. Multiplex PCR for Detection of Seven Virulence Factors and K1/K2 Capsular Serotype of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4377-4380, 2014.

Curião, T.; Morosini, M. I.; Ruiz-Garbajosa, P.; Robustillo, A.; Baquero, F.; Coque, T. M.; Canton, R. Emergence of *bla<sub>KPC-3-Tn4401a</sub>* associated with a *pKPN3/4*-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n.8, p. 1608-1614, 2010.

Cusumano, J. A.; Caffrey, A. R.; Daffinee, K. E.; Luther, M. L.; Lopes, V.; LaPlante, K. L. Weak biofilm formation among carbapenems-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 95, 2019.

Cuzon, G.; Naas, T.; Truong, H.; Villegas, M. V.; Wisell, K. T.; Carmeli, Y.; Gales, A. C.; Navon-Venezia, S.; Quinn, J. P.; Nordmann, P. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, p. 1349-1356, 2010.

Davis, S. G.; Waits, K.; Nordstrom, L.; Weaver, B.; Aziz, M.; Gauld, L.; Grande, H.; Bigler, R.; Horwinski, J.; Porter, S.; Stegger, M.; Johnson, J. R.; Liu, C. M.; Prive, L. B. Intermingled *Klebsiella pneumoniae* Populations Between Retail Meats and Human Urinary Tract Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 6, p. 892-899, 2015.

Derakhshan, S.; Peerayeh, S. N.; Bakhshi, B. Association between presences of virulence genes and antibiotic resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Laboratory Medicine**, Oxford, v. 47, p. 306-311, 2016.

Di Luca, M.; Navari, E.; Esin, S.; Menichini, M.; Barnini, S.; Trampuz, A.; Casani, A.; Batoni, G. Detection of Biofilms in Biopsies from Chronic Rhinosinusitis Patients: In Vitro Biofilm Forming Ability and Antimicrobial Susceptibility Testing in Biofilm Mode of Growth of Isolated Bacteria. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1057, p. 1-27, 2018.

Dias, C.; Ribeiro, M.; Correia-Branco, A.; Domínguez-Perles, R.; Martel, F.; Saavedra, M. J.; Simões, M. Virulence, attachment and invasion of Caco-2 cells by multidrug-resistant bacteria isolated from wild animals. **Microbial Pathogenesis**, 2019.

Dolejska, M.; Frolkova, P.; Florek, M.; Jamborova, I.; Pugertova, M.; Kutilova, I.; Cizek, A.; Guenther, S.; Literak, I. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 2784-2790, 2011.

Donnenberg, M. S. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and epithelial cells. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 3, p. 451-455, 1999.

Donnenberg, M. S.; Kaper, J. K.; Finlay, B. B. Interaction between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. **Trends in Microbiology**, v. 5, n3. P. 109-114, 1997.

DSouza, R.; Pinto, N. A.; Hwang, I.; Cho, Y.; Yong, D.; Choi, J. Panel strains of *Klebsiella pneumoniae* for beta-lactam antibiotic evaluation: their phenotypic and genotypic characterization, PeerJ, 5:e2896, 2017.

Duncan, M. J.; Mann, E. L.; Cohen, M. S.; Ofek, I.; Sharon, N.; Abraham, S. N. The distinct binding specificities exhibited by enterobacterial type-1 fimbriae are determined by their fimbrial shafts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 45, p. 37707-37716, 2005.

Durand, G. A.; Raoult, D.; Dubourg, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, p. 371-382, 2019

- Eftekhari, F.; Seyedpour, S. M. Prevalence of *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* genes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Imam Hussein Hospital in Tehran. **Iran Journal of Medical Science**, v. 40, n. 6, p. 515-521, 2015.
- El-Badawy, M. F.; Tawakol, W. M.; El-Far, S. W.; Maghrabi, I. A.; Al-Ghamdi, S. A.; Mansy, M. S.; Ashour, M. S.; Shohayeb, M. M. Molecular identification of aminoglycoside-modifying enzymes and plasmid-mediated quinolone resistance genes among *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates recovered from Egyptian patients. **International Journal of Microbiology**, 2017.
- Fang, C. T.; Chuang, Y. P.; Shun, C. T.; Chang, S. C.; Wang, J. T. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 5, p. 697–705, 2004.
- Farouk, F.; Azzazy, H. M. E.; Niessen, W. M. A. Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review. **Analytica Chimica ACTA**, v. 26, n. 890, p. 21-43, 2015.
- Fasciana, T., Gentile, B., Aquilina, M. *et al.* Co-existence of virulence factors and antibiotic resistance in new *Klebsiella pneumoniae* clones emerging in south of Italy. **BMC Infectious Disease**, v. 19, 2019.
- Fehlberg, L. C.; Carvalho, A. M.; Campana, E. H.; Gontijo-Filho, P. P.; Gales, A. C. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 16, p. 577-580, 2012.
- Felis, E.; Kalka, J.; Sochacki, A.; Kowalska, K.; Bajkacz, S.; Harnisz, M.; Korzeniewska, E. Antimicrobial pharmaceuticals in the aquatic environment- occurrence and environmental implications. **European Journal of Pharmacology**, 2019.
- Fernandez-Martinez, M.; Castillo, B. R.; Lecea-Cuello, M. J.; Rodriguez-Bano, J.; Pascual, A.; Martinez-Martinez, L. Prevalence of aminoglycoside-modifying enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamase collected in two multicenter studies in Spain. **Microbial Drug Resistance**, 2017.
- Ferraretto, A.; Gravaghi, C.; Donetti, E.; Cosentino, S.; Donida, B. M.; Bedoni, M.; Lombardi, G.; Fiorilli, A.; Tettamanti, G. New methodological approach to induce a differentiation phenotype in CACO-2 cells prior to post-confluence stage. **Anticancer Research**, v. 21, n. 6b, p. 3919-3925, 2007.
- Ferreira, R. L.; Silva, B. C. M.; Rezende, G. S.; Nakamura-Silva, R.; Pitondo-Silva, A.; Campanini, E. B.; Brito, M. C. A.; Silva, E. M. L.; Freire, C. C. M.; Cunha, A. F.; Pranchevicius, M. C. S. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and beta-lactamases encoding genes in a Brazilian Intensive Care Unit. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 3198, 2019.
- Fertas-Aissani, R.; Messai, Y.; Alouache, S.; Bakour, R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. **Pathologie Biologie**, v. 61, p. 209-216, 2013.

Flores, C.; Maria, C. P. A.; Kayo, B.; Chaia, M. C.; Angela, B.; Ana Paula, S. S. Detection of antimicrobial resistance genes in beta-lactamase and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* by patients surveillance cultures at an intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 52, p. 1678, 2016.

Flokas, M. E.; Karanika, S.; Alevizakos, M.; Mylonakis, E.; Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Pediatric Bloodstream Infections: A systematic review and meta-analysis. **Plos One**, v. 12, n. 1, 2017.

Galani, I.; Nafplioti, K.; Adamou, P.; Karaiskos, I.; Giamarellou, H.; Souli, M. Nationwide epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Greek hospitals, with regards to plazomicin and aminoglycoside resistance. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 197, 2019.

Gales, A. C.; Castanheira, M.; Jones, R. N.; Sader, H. S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance ProGram (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, n. 73, v. 4, p. 354-390, 2012.

Galimand, M.; Courvalin, P.; Lambert, T. Plasmid-Mediated High-Level Resistance to Aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* Due to 16S rRNA Methylation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 8, p. 2565-2571, 2003.

Garcia, M. I.; Le Bouguéneq, C. Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic *Escherichia coli*. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v. 94, p.201- 236, 1996.

Gautom, R. K. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 day. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2977-2980, 1997.

Gerbaba, T. K.; Green-Harrison, L.; Buret, A. G. Modeling Host-Microbiome Interactions in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Nematology**, v. 49, n. 4, p. 348-356, 2017.

Giebultowicz, J.; Tyski, S.; Wolinowska, R.; Crzybowska, W.; Zareba, T.; Drobniwska, A.; Wroczynski, P.; Natecz-Jawecki, G. Occurrence of antimicrobial agents, drug-resistant bacteria and genes in the sewage-impacted Vistula River (Poland). *Environmental Science and Pollution Research*, 2017.

Gonçalves, G. B.; Furlan, J. P. R.; Vespero, E. C.; Pelisson, M.; Stehling, E. G.; Silva, P. A. Spread of multidrug-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones in a tertiary hospital from southern Brazil. **Infection, Genetic and Evolution**, v. 56, p. 1-7, 2017.

Gonçalves, V. D.; Meirelles-Pereira, F.; Cataldo, M.; Fonseca, B. O.; Nogueira, B. A.; Olivella, J. G. B.; Esteves, F. A.; Mattos-Guaraldi, A. L.; Andrade, A. F. B.; Bello, A. R.; Pereira, J. A. A. Detection of multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from river waters flowing to the Guanabara Bay and from clinical samples of hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Biomédica**, v. 39, Supl. 1, p. 135-139, 2019.

- Gordon, A. E. K.; Mathers, A. J.; Cheong, E. Y L.; Gottlieb, T.; Kotay, S.; Walker, A. S.; Peto, T. E. A.; Crook, D. W.; Stoesser, N. The hospital water environment as a reservoir for carbapenems-resistant organisms causing hospital-acquired infections – a systematic review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, v. 64, n. 10, p. 1435-1444, 2017.
- Hancock, H.; Ferrières, L.; Klemm, P. Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infections *Escherichia coli* strains. **FEMS Microbiology Letters** , v. 267, p. 30-37, 2007.
- Hamam, S. S.; Kholy, R. M. E.; Zaki, M. E. S. Study of various virulence genes, biofilm formation and extended-Spectrum beta-lactamases resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from Urinary Tract Infections. **The Open Microbiology Journal**, v. 13, p. 249-255, 2019.
- Hamed, S. M.; Aboshanab, K. M. A.; El-Mahallawy, H. A.; Helmy, M. M.; Ashour, M. S.; Elkhatib, W. F. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Gram-negative pathogens isolated from cancer patients in Egypt. **Microbial Drug Resistance**, 2018.
- Hao, W. L.; Lee, Y. K. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. **Methods in Molecular Biology**, v. 268, p. 491-502, 2004.
- Haryani, Y.; Noorzaleha, A. S.; Fatimah, A. B.; Noorjahan, B. A.; Patrick, G. B.; Shamsinar, A. T.; Laila, R. A. S.; Son, R. Incidence of *Klebsiella pneumoniae* in street foods sold in Malaysia and their characterization by antibiotic resistance, plasmid profiling, and RAPD–PCR analysis. **Food Control**, v.18, p.847–853, 2007.
- Hasse, B.; Abbassi, M. S.; Benlabidi, S.; Ruiz-Ripa, L.; Mama, O. M.; Ibrahim, C.; Hasse, A.; Torres, C. Genetic characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from wastewater and river water in Tunisia: predominance of CTX-M-15 and high genetic diversity. **Environmental Science and Pollution Research**, 2020.
- Hawkey, P.M. The growing burden of antimicrobial resistance. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, Suppl, 1, 2008.
- Hennequin, C.; Robin, F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, n. 3, p. 333-341, 2016.
- Henriques, I.; Moura, A.; Alves, A.; Saavedra, M. J.; Correia, A. Molecular characterization of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, SFC-1, from *Serratia fonticola* UTAD54. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 2321–2324, 2012.
- Hirata Jr, R.; Souza, S. M. S.; Rocha-de-Souza, C. M; Andrade, A. F. B.; Monteiro-Leal L. H.; Formiga, L. C. D.; Mattos-Guaraldi, A. L. Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerization by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 36, p. 125-130, 2004.
- Hirsch, E. B.; Tam, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. 1119-1125, 2010.

Hladicz, A.; Kittinger, C.; Zarfel, G. Tigecycline Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Austrian River Water. *Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 14, 2017.

Holt, K. E.; Wertheim, H.; Zadoks, R. N.; Baker, S.; Whitehouse, C. A.; Dance, D.; Jenney, A.; Connor, T. R.; Hsu, L. Y.; Severin, J.; Brisse, S.; Cao, H.; Wilksch J.; Gorrie, C.; Schultz, M. B.; Edwards, D. J.; Nguyen, K. V.; Nguyen, T. V.; Dao, T. T.; Mensink, M.; Minh, V. L.; Nhu, N. T. K.; Schultsz, C.; Kuntaman, K.; Newton, P. N.; Moore, C. E.; Strugnell, R. A.; Thomson, N. R. 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**, v. 1212, n. 27, p. E3574-3581, 2015.

Jacoby, G. A.; Strahilevitz, J.; Hooper, D. C. Plasmid-mediated quinolone resistance. **Microbiology Spectrum**, vol. 2, no. 5, 2014.

Jiang, L.; Hu, X.; Yin, D.; Zhang, H.; Yu, Z. Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu River, Shanghai, China. **Chemosphere**, v. 82, n. 6, p. 822–828, 2011.

Jiang, Y.; Zhou, Z.; Qian, Y.; Wei, Z.; Yu, Y.; Hu, S.; Li, L. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in extender-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Zhejiang: v. 61, n. 5, p. 1003-1006, may. 2008.

Jin, L.; Wang, R.; Wang, X.; Wang, Q.; Zhang, Y.; Tin, Y.; Wang, H. Emergence of *mcr-1* and carbapenemases genes in hospital sewage water in Beijing, China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 1, p. 84-87, 2018.

Jones, R. N.; Guzman-Blanco, M.; Gales, A. C.; Gallegos, B.; Castro, A. L.; Martino, M. D.; Veja, S.; Zurita, J.; Cepparulo, M.; Castanheira, M. Susceptibility rates in Latin American Nations: reports from a regional resistance surveillance proGram (2011). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. 672-681, 2013.

Juan, C. H.; Chuang, C.; Chen, C. H.; Lin, Y. T. Clinical characteristics, antimicrobial resistance and capsular types of community-acquired, healthcare-associated, and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 1, 2019.

Justo-da-Silva, L. H.; De-Azevedo, A. N.; Bueno, A. C.; Montezzi, L. F.; Leobons, M. B. G. P.; Alves, M. S.; Moreira, B. M. Diversity of clonal types of *Klebsiella pneumoniae* causing infections in intensive care neonatal patients in a large urban setting. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2019.

Kalleta, T.; Hengartner, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v.5, n. 5, p. 387-398, 2006.

Kamaladev, A.; Balamurugan, K. Response of *Caenorhabditis elegans* during *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, Suppl 3, 2014.

Kang, C. I.; Kim, S. H.; Bang, J. W.; Kim, H. B.; Kim, N. J.; Kim, E. C.; Oh, M. D.; Choe, K. W. Community-acquired versus nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: clinical features, treatment outcomes and clinical implication of antimicrobial resistance. **Journal of Korean Medical Science**, v. 21, p. 816-822, 2006.

Karlowisky, J. A.; Hoban, D. J.; Hackel, M. A.; Lob, S. H.; Sahm, D. F. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Latin America countries: SMART 2013-2015. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 343-348, 2017

Kauffman, A. L.; Gyudieva, A. V.; Mabus, J. R.; Ferguson, C.; Yan, Z.; Homby, P. J. Alternative functional in vitro models of human intestinal epithelia. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, n. 79, 2013.

Khaertynov, K. S.; Anokhin, V. A.; Rizvanov, A. A.; Davidiyuk, Y. N.; Semyenova, D. R.; Lubin, S. A.; Skvortsova, N. N. Virulence factors and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from neonates with sepsis. **Frontiers in Medicin**, v. 14, 2018.

Khairy, R. M.; Mahmoud, M. S.; Shady, R. R.; Esmail, M. A. M. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital-acquired infections: concomitant analysis of antimicrobial resistant strains. **The International Journal of Clinical Practice**, 2019.

Khan, F. A.; Hellmark, B.; Ehricht, R.; Soderquist, B.; Jass, J. Related carbapenemases-producing *Klebsiella* isolates detected in both a hospital and associated aquatic environment in Sweden. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, p. 2241-2251, 2018.

Kiffer, C.; Hsiung, A.; Oplustil, C.; Sampaio, J.; Sakagami, E.; Turner, P.; Mendes, C.; The MYSTIC Brazil Group. Antimicrobial Susceptibility of Gram Negative Bacteria in Brazilian Hospitals: the MYSTIC ProGram Brazil 2003. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 216-224, 2005.

Kim, S.; Aga, D.S. Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 10, n.8, p. 559-573, 2007.

Knothe, H.; Shah, P.; Krcmery, V.; Antal, M.; Mitsuhashi, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, n. 6, p. 315-317, 1983.

Koczura, R.; Kaznowski, A. Occurrence of the *Yersinia* high-pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 35, p. 197-202, 2003.

Kotb, D. N.; Mahdy, W. K.; Mahmoud, M. S.; Khairy, R. M. M. Impact of co-existence of PMQR genes and QRDE mutations on fluorquinolones resistance in Enterobacteriaceae strains isolated from community and hospital acquired UTIs. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, p. 979, 2019.

Krapp, F.; Morris, A. R.; Ozer, E. A.; Hauser, A. R. Virulence Characteristics of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains from Patients with Necrotizing Skin and Soft Tissue Infections. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

Kumar, M.; Jaiswal, S.; Sodhi, K. K.; Shree, P.; Singh, D. K.; Agrawal, P. K.; Shukla, P. Antibiotics bioremediation: perspectives on its ecotoxicity and resistance. **Environment International**, v. 124, p. 448-461, 2019

Kurz, C. L.; Ewbank, J. J. *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 142-144, 2000.

Kussell, E.; Kishony, R.; Balaban, N.; Leibler, S. Bacterial Persistence: A Model of Survival in Changing Environments. **Genetics**, v. 169, n. 4, p. 1807-1814, 2005.

Lascols, C.; Hackel, M.; Hujer, A. M.; Marshall, S. H.; Bouchillon, S. K.; Hoban, D. J. Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel  $\beta$ -lactamases: a snapshot of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases through the world. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p. 1632-1639, 2012.

Lavigne, J.P.; Blanc-Potard, A. B.; Bourg, G.; Moreau, J.; Chanal, C.; Bouziges, N.; O'callaghan, D.; Sotto, A. Virulence genotype and nematode-killing properties of extra-intestinal *Escherichia coli* producing CTX-M  $\beta$ -lactamases. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 12, p. 1199-1206, 2006.

Lavigne, J. P.; Cuzon, G.; Combescure, C.; Bourg, G.; Sotto, A.; Nordmann, P. Virulence of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Harboring *bla*<sub>KPC-2</sub> Carbapenemase Gene in a *Caenorhabditis elegans* Model. **Plos One**, v. 8, n. 7, p. e67847, 2013.

Lepuschitz, S.; Schill, S.; Stoeger, A.; Pekard-Amenitsch, S.; Huhulescu, S.; Inreiter, N.; Hartl, R.; et al. Whole genome sequencing reveals resemblance between ESBL-producing and carbapenems resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Australian rivers and clinical isolates from hospital. **Science of the Total Environment**, v. 662, p. 227-235, 2019.

Létoffé, S.; Chalabaev, S.; Dugay, H.; Stressmann, F.; Audrain, B.; Portais, J-C.; Letisse, F.; Ghigo, J-M. Biofilm microenvironment induces a widespread adaptive amino-acid fermentation pathway conferring strong fitness advantage in *Escherichia coli*. **PLoS Genetics**, v. 13, n.5, 2017.

Leung, M.C.K.; Williams, P.L.; Benedetto, A.; Au, C.; Helmcke, K.J.; Aschner, M.; Meyer, J.N. Review: *Caenorhabditis elegans*: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 106, n. 1, p. 5-28, 2008.

Lubbert, C.; Baars, C.; Dayakar, A.; Lippmann, N.; Rodloff, A.C.; Kinzig, M.; Sorgel, F. Environmental Pollution with Antimicrobial Agents from Bulk Drug Manufacturing Industries in Hyderabad, South India, is Associated with Dissemination of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase and Carbapenemase-Producing Pathogens. **Infection**, v. 45, n. 4, p. 479-491, 2017.

- Lupo, A.; Coyne, S.; Berendonk, T. U. Origin and Evolution of Antibiotic Resistance: The Common Mechanisms of Emergence and Spread in Water Bodies. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 18, 2012.
- Ma, L. C.; Fang, C. T.; Lee, C. Z.; Shun, C. T.; Wang, J. T. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection. **Journal of Infectious Disease**, v. 192, n. 1, p. 117–128, 2005.
- Ma, Y. X.; Wang, C. Y.; Li, Y. Y.; Li, J.; Wan, Q. Q.; Chen, J. H.; Tay, F. R.; Niu, L. N. Considerations and Caveats in combating ESKAPE pathogens against Nosocomial Infections. **Advanced Science**, v. 7, n. 1, 2019.
- MacDougall, C.; Powell, J. P.; Johnsons, C. K.; Edmond, M. B.; Polk, R. E. Hospital and Community Fluoroquinolone Use and Resistance in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in 17 US Hospitals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 435-440, 2005.
- Madigan, M. T.; Martink, J. M.; Bender, K. S.; Buckley, D. H.; Stah, D. A. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre, Ed: Artmed, 14<sup>a</sup> ed. 2016.
- Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E. Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; olsson-Liljequist, B.; Paterson, D.L.; Rice, L.B.; Stelling, J.; Struelens, M.J.; Vatopoulos, A.; Weber, J.T.; Monnet, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**. 2012.
- Maroncle, N.; Balestrino, D.; Rich, C.; Forestier, C. Identification of *Klebsiella pneumoniae* genes involved in intestinal colonization and adhesion using signature tagged mutagenesis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4729-4732, 2002.
- Marques, C.; Menezes, J.; Belas, A.; Aboim, C.; Cavaco-Silva, P.; Trigueiro, G.; Gama, L. T.; Pomba, C. *Klebsiella pneumoniae* causing urinary tract infections in companion animals and humans: population structure, antimicrobial resistance and virulence genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2018.
- Marti, E.; Variatza, E.; Balcázar, J. L. Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 7, p. O456-O459, 2014.
- Marti, E.; Variatza, E.; Balcázar, J. L. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 36-41, 2014b.
- Mathers, A. J.; Vegesana, K.; Mesner, I. G.; Barry, K. E.; Pannone, A.; Baumann, J.; Crook, D. W.; Stoesser, N.; Kotay, S.; Carroll, J, Sifri, D. Intensive Care Unit Wastewater Interventions to Prevent Transmission of Multispecies *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase–Producing Organisms. **Clinical Infectious Diseases**, v. 67, n. 2, 2018.
- MC Lam, M.; Wyres, K. L.; Duchene, S.; et al. Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination. **Nature Communications**, v. 9, 2018.

Meisel, J. D.; Kim, D. H. Behavioral avoidance of pathogenic bacteria by *Caenorhabditis elegans*. **Trends in Immunology**, v. 35, p. 465-470, 2014.

Merritt, J. H.; Kadouri, D. E.; O'Tale, G. A. Growing and analyzing static biofilm. **Current Protocol in Microbiology**, Chapter 1, Unit 1B1, 2005.

Minandri, F.; Imperi, F.; Frangipani, E.; Bonchi, C.; Visaggio, D.; Facchini, M.; Pasquali, P.; Bragonzi, A.; Visca, P. Role of Iron Uptake Systems in *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Airway Infection. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 8, p. 2324-2335, 2016.

Mishra, M.; Panda, S.; Barik, S.; Sarkar, A.; Singh, D. V.; Mohapatra, H.; Antibiotic resistance profile, outer membrane proteins, virulence factors and genome sequence analysis reveal clinical isolates of Enterobacter are potential pathogens compared to environmental isolates. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020.

Mir, D. A.; Balamurugan, K. In vitro and in vivo efficacy of *Caenorhabditis elegans* recombinant antimicrobial protein against Gram-negative bacteria. **Biofouling**, p. 1-22, 2019.

Moghadas, A. J.; Kalantari, F.; Sarfi, M.; Shahhooseini, S.; Mirkalantar, S. Evaluation of virulence factors and antibiotic resistance patterns in clinical urine isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Semnan, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 11, n. 7, 2018.

Mondal, A. H.; Siddiqui, M. T.; Sultan, I. Hap, Q. M. R. Prevalence and diversity of *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*CTX-M variants among multidrug resistant *Klebsiella* spp. from an urban riverine environment in India. **International Journal of Environmental Health Research**, 2018.

Monteiro, J.; Santos, A.; Asensi, M. D.; Peirano, G.; Gales, A. C. First report KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 333-334, 2009

Muller, L. M.; Gorter, K. J.; Hak, E.; Goudzwaard, W. L.; Schellevis, F. G.; Hoepelman, A. I.; Rutten, G. E. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 3, p. 281-288, 2005.

Mulvey, M. A. Adhesion and entry of uropathogenic Escherichia coli. **Cellular Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 257-271, 2002.

Munita, J.M.; Arias, C.A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.

Munoz-Price, L. S.; Poirel, L.; Bonomo, R. A.; Schwaber, M. J.; Daikos, G. L.; Cornaglia, G.; Garau, J.; Gniadkowski, M.; Hayden, M. K.; Kumarasamy, K.; Livermore, D. M.; Maya, J. J.; Nordman, P.; Patel, J. B.; Paterson, D. L.; Pitout, J.; Villegas, M. V.; Wang, H.; Woodford, N. Quinn, J. P. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 785-796, 2013.

Navon-Venezia, S.; Kondratyeva, K.; Carattoli, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 252-275, 2017.

Nirwati, H.; Sinanjung, K.; Fahrnunissa, F.; Wijaya, F.; Napitupulu, S.; Hati, V. P. Hakim, M. S.; Meliala, A.; Aman, A. T.; Nuryastuti, T. Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. **BMC Proceedings**, v. 13, 2019.

Niveditha, S.; Pramodhini, S.; Umadevi, S.; Kumar, S.; Stephen, S. The Isolation and the Biofilm Formation of Uropathogens in the Patients with Catheter Associated Urinary Tract Infections (UTIs). **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, v. 6, n. 9, p. 1478–82, 2012.

Nogueira, B. A.; Olivella, J. G. B., Gil, A. C.; Meirelles-Pereira, F.; Gonçalves, V. D.; Andrade, A. F. B.; Bello, A. R.; Pereira, J. A. A. Detection of bacterial samples on the aquatic ecosystems adjacent to Saquarema Lagoon – Rio de Janeiro. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. Salvador: v. 14, n. 2, p. 147-152, 2015.

Nordmann, P.; Naas, T.; Poirel, L. Global spread of Carbapenemase producing Enterobacteriaceae. **Emergence and Infectious Diseases**, v. 17, p. 1791-1798, 2011.

Oliveira, C. B. S.; Dantas, V. C. R.; Neto, R. M.; Azevedo, P. R. M.; Melo, M. C. N. Frequencia e perfil de resistência de *Klebsiella spp.* em um hospital universitário de Natal/RN durante 10 anos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 6, n. 589-594, 2011.

Oliveira, S.; Moura, R. A.; Silva, K. C.; Pavez, M.; McCulloch, J. A.; Dropa, M.; Matté, M. H.; Mamizuka, E. M.; Sato, M. I. Z.; Castro, A. F. P.; Lincopan, N. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban Rivers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 849-852, 2014.

Oplustil, C.; Mendes, C.; Sakagami, E.; Turner, P.; Kiffer, C.; The MYSTIC Brazil Group. Antimicrobial Susceptibility in Intensive Care Units: MYSTIC ProGram Brazil 2002. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 9, n. 1, p. 44-51, 2005.

Paczosa, M. K.; Meccas, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 15, n. 8, 629-691, 20016.

Pantel, A.; Dunyach-Remy, C.; Essebe, C. N.; Mesureur, J.; Sotto, A.; Pagès, J. M.; Nicolas-Chanoine, M. H.; Lavigne, J. P. Modulation of Membrane Influx and Efflux in *Escherichia coli* Sequence Type 131 Has an Impact of Bacterial Motility, Biofilm Formation and Virulence in a *Caenorhabditis elegans* Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 5, 2016.

Paterson, D. L.; Bonomo, R. A. Extended-Spectrum Beta-Lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Review**, v. 18, p. 657-686, 2005.

Pawar, M.; Mehta, Y.; Khurana, P.; Chaudhary, A.; Kulkarni, V.; Trehan, N. Ventilator-associated pneumonia: incidence, risk factors, outcome, and microbiology. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 17, p. 22–28, 2003.

Picão, R. C.; Cardoso, J. P.; Campana, E. H.; Nicoletti, A. G.; Petrolini, F. V. B.; Assis, D. M.; Juliano, L.; Gales, A. C. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and Enterobacteriaceae in sewage. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 80-85, 2013.

Piperaki, E. T.; Syrogiannopoulos, G. A.; Tzouveleki, L. S.; Daikos, G. L. *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 36, n. 10, p. 1002-1005, 2017.

Pitout, J. D. D.; Hossain, A.; Hanson, N.D. Phenotypic and Molecular Detection of CTX-M-b-Lactamases Produced by Escherichia coli and Klebsiella spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p5715–5721, 2004.

Pitout, J. D. D.; Laupland, K. B. Extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 8, n.3, p. 159-166, 2008.

Pitout, J. D. D.; Normand, P.; Laupland, K. B.; Poirel, L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in the community. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 56, n. 1, p. 52-59, 2005.

Podschun, R.; Pietsch, S.; Holler, C.; Ullmann, U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 3325-3327, 2001.

Poirel, L.; Liard, A.; Rodriguez-Martinez, J. M.; Nordmann, P.; Vibronaceae as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 1118-1121, 2005.

Ramirez, M. S.; Tolmasky, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**, v. 13, p. 151-171, 2010.

Randrianirina, F.; Vedy, S.; Rakotovao, D.; Ramarokoto, C. E.; Ratsitohaina, H.; Carod, J. F.; Ratsima, E.; Morillon, M.; Talarmin, A. Role of contaminated aspiration tubes in nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-2 and CTX-M-15 extended-spectrum b-lactamases. **Journal of Hospital Infection**, v. 72, p. 23-29, 2009.

Rasko, D.A.; Sperandio, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 2, p. 117-128, 2010.

Ray, C.; Shenoy, A. T.; Orihuela, C. J.; Gonzalez-Juarbe, N. Killing of *Serratia marcescens* biofilms with chloramphenicol. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 19, 2017.

Remya, P. A.; Shanthi, M.; Sekar, U. Characterization of virulence genes associated with pathogenicity in *Klebsiella pneumoniae*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 210-218, 2019.

- Rojas, L. J.; Weinstock, G. M.; Cadena, E. D. L.; Diaz, L.; Rios, R.; Hanson, B. M. et al. An Analysis of the Epidemic of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing K. pneumoniae: Convergence of Two Evolutionary Mechanisms Creates the “Perfect Storm”. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 217, p. 82-92, 2018.
- Rosa-Zamboni, D.; Ochoa, S. A.; Laris-González, A.; Cruz-Córdova, A.; Escalona-Venegas, G.; Pérez-Avendano, G.; Torres-Garcia, M.; Suárez-Mpra, R.; et al. Everybody hands-on to avoid ESKAPE: effect of sustained hand hygiene compliance on healthcare-associated infections and multidrug resistance in a paediatric hospital. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 12, 2018.
- Rossi, F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138-1143, 2011.
- Rossi, F.; Andreazzi, D. B. **Resistência Bacteriana: Interpretando o antibiograma**. São Paulo. 2005. Ed Atheneu: 21-26.
- Runcharoen, C.; Moradigaravand, D.; Blane, B.; Paksanont, S.; Thammachote, J.; Anun, S.; Parkhill, J.; Chantratita, N.; Peacock, S. J. Whole Genome sequencing reveals high-resolution epidemiological links between clinical and environmental *Klebsiella pneumoniae*. **Genome Medicine**, v. 9, n. 6, 2017.
- Sabtcheva, S.; Saga, T.; Kantardjiev, T.; Ivanova, M.; Ishii, Y.; Kaku, M. Nosocomial spread of armA-mediated high-level aminoglycoside resistance in Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M-3 beta-lactamases in a cancer hospital in Bulgaria. **Journal of Chemotherapy**, v. 20, n. 5, p. 593-599, 2008.
- Sader, H.; Jones, R.; Gales, A.; Silva, J.; Pignatari, A.; SENTRY Participant Group. SENTRY Antimicrobial Surveillance ProGram Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 25-79, 2004.
- Sahly, H.; Podschun, R.; Oelschlaeger, T. A.; Greiwe, M.; Parolis, H.; Hasty, D.; Kekow, J.; Ullmann, U.; Ofek, I.; Sela, S. Capsule Impedes Adhesion to an Invasion of Epithelial Cells by *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 12, p. 6744-6749, 2000.
- Sahly, H.; Navon-Venezia, L.; Roesler, A.; Hay, A.; Carmeli, Y.; Podschun, R.; Hennequin, C.; Forestier, C, Ofel, I. Extended-Spectrum Beta-Lactamase Production Is Associated with an Increase in Cell Invasion and Expression of Fimbrial Adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3029, 2008.
- Santos, C. S.; Santos, L. S.; Souza, M. C.; Dourado, F. S.; Dias, A. S.; Sabbadini, O. S.; Pereira, G. A.; Cabral, M. C.; Hirata Júnior, R.; Mattos-Guaraldi, A. L. Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxinogenic and toxinogenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. **Microbiology and Immunology**, v. 54, p. 1-10, 2010.
- Savin, M.; Bierbaum, G.; Hammerl, J. A.; Heinemann, C.; Parcina, M.; Sib, E.; Voigt, A.; Kreyenschmidt, J. ESKAPE bacteria and Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* isolates from wastewater and process water from German poultry slaughterhouses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 8, 2020.

- Scavuzzi, A. M. L.; Firmo, E. F.; Oliveira, E. M.; Lopes, A. C. S. Emergence of *bla<sub>NDM-1</sub>* associated with the *aac(6')-Ib-cr*, *acrB*, *cps* and *mrkD* genes in a clinical isolate of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* from Recife-PE, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.
- Schulenburg, H.; Ewbank, J. J. The genetics of pathogen avoidance in *Caenorhabditis elegans*. **Molecular microbiology**, v. 66, n. 3, p. 563-570, 2007.
- Seki, L. M.; Pereira, P. S.; Souza, M. P. Conceição, M. S.; Marques, E. A.; Porto, C. O. Molecular epidemiology of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 70, p. 274-277, 2011.
- Schroll, C.; Barken, K. B.; Krogfelt, K. A.; Struve, C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 179, 2010.
- Sharma, S.; Mohan, H.; Sharma, S.; Chhibber, S. A comparative study of induction of pneumonia in mice with planktonic and biofilm cells of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 5, p. 295-303, 2011.
- Shields, R. K.; Clancy, C. J.; Press, E. G.; Nguyen, M. H. Aminoglycosides for Treatment of Bacteremia Due to Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 22, n. 60, p. 3187-3192, 2016.
- Shtonda, B. B.; Avery, L. Dietary choice behavior in *Caenorhabditis elegans*. **The Journal of experimental biology**, v.209, p. 89-102, 2006.
- Sibanda, T.; Selvarajan, R.; Tekere, M. Urban effluent discharges as causes of public and environmental health concerns in South Africa's aquatic milieu. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 22, n. 23, p. 18301–18317, 2015.
- Sievert, D. M.; Ricks, P.; Edwards, J. R.; Schneider, A.; Patel, J.; Srivinasan, A.; Kallen, A.; Limbago, B.; Fridkin, S.; et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with health care associated infections: summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 34, n. 1, 2013.
- Sousa, A. B. A.; Ramalho, F. L.; Camargo, B. Prevalence of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in hospitalized patients. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 1915-1932, 2020.
- Souza, C., Simpson-Louredo, L., Mota, H.F. *et al.* Virulence potential of *Corynebacterium striatum* towards *Caenorhabditis elegans*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 112, p. 1331–1340, 2019.
- Souza Lopes, A. C.; Rodrigues, J. F.; Morais Júnior, M. A. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. **Microbiological Research**, v. 160, n. 1, p. 37-46, 2005.

Stahlhut, S. G.; Struve, C.; Krogfelt, K. A.; Reisner, A. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 65, p. 350–359, 2012.

Struve, C.; Krogfelt, K. A. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Environmental microbiology**, v. 6, n. 6, p. 584–90, 2004.

Styer, K. L.; Hopkins, G. W.; Bartra, S. S.; Plano, G. V.; Frothingham, R.; Aballay, A. *Yersinia pestis* kills *Caenorhabditis elegans* by a biofilm-independent process that involves novel virulence factors. **Scientific Reports**, v. 6, n. 10, p. 992–997, 2005.

Surgers, L.; Boyd, A.; Girard, P. M.; Arlet, G. Decré, D. Biofilm formation by ESBL-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Medical Microbiology**, 2018

Surgers, L.; Boyd, A.; Girard, P. M.; Arlet, G.; Decré, D. ESBL-producing strain of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* K2, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, p. 1687–1688, 2016.

Tavares, W. **Antibiótico e Quimioterápicos para o Clínico**. 2 ed. Atheneu, 2009.

Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

Trabulsi, L. B.; Alterthum, F. **Microbiologia**. 5 ed. Atheneu, 2008.

Turton, J. F.; Perry, C.; Elgohari, S.; Hampton, C. V. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 541–547, 2010.

Van De Klundert, J. A.; Vliegthart, J. S. Nomenclature of aminoglycoside resistance genes: a comment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Leiden: v. 37, n. 4, p. 927–929, apr. 1993

Vaziri, S.; Afsharian, M.; Mansouri, F.; Azizi, M.; Nouri, F.; Madadi-Goli, N.; Afshar, Z. M.; Zamanian, M. H.; Alvandi, A.; Ahmadi, K. Frequency of *qnr* and *aac(6')Ib-cr* genes among ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Kermanshah, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 13, n. 7, 2020.

Verlicchi, P.; Al Aukidy, M.; Galletti, A.; Petrovic, M.; Barceló D. Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 430, p. 109–118, 2012.

Vuotto, C.; Longo, F.; Balice, M. P.; Donelli, G.; Varaldo, P. E. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 743–758, 2014.

Yan, J.; Pu, S.; Jia, X.; Xu, X.; Yang, S.; Shi, J.; Sun, S.; Zhang, L. Multidrug resistance mechanisms of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Chongqing, China. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 37, p. 398–407, 2017.

- Yan, J. J.; Wu, J. J.; Ko, W. C.; Tsai, S. H.; Chuang, C. L.; Wu, H. M.; Lu, Y. J.; Li, J. D. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 1007-1012, 2004.
- Yan, L.; Liu, D.; Wang, X-H.; Wang, Y.; Zhang, B.; Wang, M.; Xu, H. Bacterial plasmid-mediated quinolone resistance genes in aquatic environments in China. **Scientific Reports**, 2017.
- Yang, D.; Zhang, Z. Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum beta-lactamases. **Journal of Hospital Infection**, v. 68, p. 396-371, 2008.
- Yang, P. W.; Lin, H. D.; Wang, L. M. Pyogenic liver abscess associated with septic pulmonary embolism. **Journal of the Chinese Medical Association: JCMA**, v. 7, n. 1, p. 442-447, 2008.
- Yang, T. Y.; Wang, D. F.; Lin, J. E.; Griffith, B. T. S.; Lian, S. H.; Hong, Z. D.; Tseng, S. P. Contributions of insertion sequences conferring colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2020.
- Walsh, T. R.; Emerging carbapenemases: a global perspective. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, Suppl. 3, p. S8-S14, 2010.
- Wang, M.; Sahm, D. F.; Jacoby, G. A.; Hooper, D. C. Emerging Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Associated with the *qnr* Gene in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolated in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1295-1299, 2004.
- Wang, Q.; Li, B.; Tsang, A. K. L.; Yi, Y.; Woo, P. C. Y.; Liu, C. H. Genotypic analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Beijing Hospital reveals high genetic diversity and clonal population structure of drug-resistant isolates. **Plos One**, v. 8, n. 2, 2013.
- Willems, R. J.; Hanage, W. P.; Bessen, D. E. E. J. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology**, v. 35, p. 872-900, 2011.
- Wilksch, J. J.; Yang, J.; Clements, A.; Gabbe, J. L.; Short, K. R.; Cao, H.; Cavaliere, R.; James, C. E.; Whitchurch, C. B.; Schembri, M. A.; Chuah, m. L.; Liang, Z. X.; Wijburg, O. L.; Jenney, A. W.; Lithgow, T.; Strugnell, R. A. MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 8, 2011.
- Woldu, M. A. *Klebsiella pneumoniae* and its growing concern in healthcare settings. **Journal of Clinical and Experimental Pharmacology**, v. 6, n. 1, 2016.
- Woodford, N.; Turton, J. F.; Livermore, D. M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology**, v. 35, p. 736-755, 2011.
- Woodford, N.; Wareham, D. W.; Guerra, B.; Teale, C. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an

emerging public health risk of our own making? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 2, p. 287–291, 2014.

Wyres, K. L.; Lam, M. M. C.; Holt, K. E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. **Nature Reviews**, 2020.

Zhang, X.; Lu, X.; Zong, Z. *Enterobacteriaceae* producing the KPC-2 carbapenemase from hospital sewage. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 2, p. 204-206, 2012.

Zhen, X.; Lundborg, C. S.; Sun, X.; Hu, X.; Dong, H. Economic burden of antibiotic resistance in ESKAPE organisms: a systematic review. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 137, 2019.

## ANEXO – Tabela de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Perfil clonal de cepas multirresistentes de *K. pneumoniae* demonstrando os sítios/pontos de isolamento, perfil de resistência, genes de resistência e virulência, além da capacidade de formação de biofilme em superfíciesabióticas diversas

Sítio/ponto de isolamento	Perfil clonal	Cepas isoladas	Perfil de resistência	Genes de resistência	Genes de virulência	biofilme poliestireno	Biofilme em vidro
Ponto 4	A'1	P4I12	CTX/CRO/CAZ/CPM/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>TEM</sub>/qnrB</i>	-	FDA	+++
Ponto 4	A'1	P4I13	CTX/CRO/CAZ/CPM/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>SHV</sub>/qnrB</i>	<i>fimH/mrkD</i>	FDA	+++
Ponto 2	A'2	P2C8	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/AMI/KAN/TOB/CIP/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>KPC</sub>/aacc2</i>	-	FDA	++
Ponto 2	A'2	P2C9	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/TOB/CIP/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	<i>fimH</i>	FDA	+++
Ponto 3	B'1	P3C7	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/TOB/CIP/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	<i>fimH</i>	FDA	+++
Ponto 3	B'2	P3C6	CTX/CRO/CPM/GEN/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>aacc2/qnrA</i>	-	FDA	+++
Ponto 3	B'3	P3I3	CTX/CRO/CAZ/CPM/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	<i>fimH</i>	FDA	+++
Ponto 3	B'3	P3I9	CTX/CRO/CAZ/CPM/TOB/CIP/NOR	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	<i>fimH</i>	MA	+++
Ponto 3	B'3	P3I11	CTX/CRO/CAZ/CPM/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	<i>fimH</i>	MA	+++
Ponto 3	C'1	P3I1	CTX/CRO/CAZ/CPM/AMI/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>qnrA</i>	-	MA	+++
Sangue	D'1	B7	CTX/CRO/CAZ/CPM/KAN/CIP/NOR	<i>bla<sub>TEM</sub>/bla<sub>CTX-M</sub>/bla<sub>SHV</sub></i>	<i>fimH/mrkD</i>	FDA	+++
Sec. traqueal	D'1	B10	CTX/CRO/CAZ/CPM/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>qnrA</i>	<i>fimH</i>	FDA	+
Ponto 4	E'1	P4I14	CTX/CRO/CAZ/CPM/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	<i>fimH</i>	FDA	+++
Ponto 4	E'1	P4I17	CTX/CRO/CAZ/CPM/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	-	MA	+++
Sangue	E'2	B2	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/KAN/TOB/CIP	<i>bla<sub>TEM</sub>/bla<sub>CTX-M</sub>/aacc3</i>	<i>fimH/mrkD</i>	FDA	++
Ponto 3	F'1	P3I4	CTX/CRO/CAZ/CPM/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	-	FDA	++
Ponto 3	F'1	P3I10	CTX/CRO/CAZ/CPM/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	-	FDA	+++
Ponto 3	F'1	P3C11	CTX/CRO/CPM/GEN/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>KPC</sub></i>	-	FDA	+++
Ponto 4	F'1	P4I10	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	-	FDA	+++
Ponto 4	F'1	P4I15	CTX/CRO/CAZ/CPM/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	-	MA	+++
Ponto 2	G'1	P2C3	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/KAN/IMI	<i>bla<sub>SHV</sub>/aacc3</i>	<i>fimH/mrkD</i>	FDA	+
Ponto 2	G'1	P2C7	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/KAN/TOB/IMI/ETP	<i>bla<sub>CTX-M</sub>/aacc3</i>	-	FDA	+++
Ponto 2	G'2	P2G2	CTX/CRO/GEN/TOB/IMI	<i>aacc2</i>	-	FDA	+++
Ponto 2	G'2	P2G9	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/TOB/CIP/NOR/IMI/MER	<i>aacc2</i>	-	FDA	+++

Sítio/ponto de isolamento	Perfil clonal	Cepas isoladas	Perfil de resistência	Genes de resistência	Genes de virulência	biofilme poliestireno	Biofilme em vidro
Ponto 1	H'1	P1C1	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/CIP/IMI	-	<i>fimH</i>	FDA	++
Ponto 1	H'1	P1C5	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/AMI/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	-	<i>fimH</i>	FDA	++
Ponto 1	H'2	P1C2	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/CIP/IMI	-	<i>fimH</i>	FDA	+
Ponto 2	I'1	P2I7	CTX/CRO/CAZ/CPM/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>KPC</sub></i>	<i>fimH/mrkD</i>	FDA	+++
Ponto 2	I'1	P2I11	CTX/CRO/CAZ/CPM/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	<i>fimH/mrkD</i>	MA	+++
Ponto 2	I'1	P2I12	CTX/CRO/CAZ/CPM/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	-	FDA	+++
Ponto 2	I'1	P2G1	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	<i>fimH/kfuBC</i>	FDA	++
Ponto 1	I'2	P1C25	CTX/CRO/CAZ/CPM/CIP/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>TEM</sub>/bla<sub>KPC</sub></i>	<i>fimH/kfuBC</i>	FDA	+++
Ponto 1	I'2	P1C26	CTX/CRO/TOB/CIP/IMI/ETP	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	<i>fimH</i>	MA	+++
Ponto 2	I'2	P2I2	CTX/CRO/CPM/GEN/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	<i>fimH</i>	FDA	+++
Ponto 2	I'2	P2I3	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	<i>fimH/kfuBC</i>	FDA	+++
Ponto 2	I'2	P2I5	CTX/CRO/CAZ/CPM/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>CTX-M</sub>/bla<sub>KPC</sub></i>	-	FDA	+++
Ponto 4	I'2	P4C9	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/AMI/CIP/IMI/ETP/MER	<i>aacc2</i>	-	FDA	+++
Ponto 3	I'3	P3I2	CTX/CRO/CAZ/CPM/TOB/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>CTX-M</sub>/qnrA</i>	<i>fimH/mrkD</i>	FDA	++
Ponto 4	I'3	P4C3	CTX/CRO/CAZ/CPM/CIP/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>CTX-M</sub>/qnrB</i>	<i>fimH/mrkD</i>	FDA	+++
Ponto 4	I'3	P4C5	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/TOB/CIP/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	<i>fimH</i>	FDA	+++
Sangue	I'3	B12	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/KAN/TOB/CIP/NOR	<i>bla<sub>SHV</sub>/bla<sub>CTX-M</sub>/aacc3/qnrA</i>	<i>fimH/mrkD</i>	FDA	+++
Swab de orofaringe	I'3	B13	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/TOB/CIP	<i>aacc2/qnrA/qepA</i>	<i>fimH/mrkD</i>	FDA	+
Urina	I'3	B18	CTX/CRO/CAZ/CPM/KAN/CIP/NOR/IMI/ETP/MER	<i>bla<sub>TEM</sub>/qnrA</i>	<i>fimH/kfuBC</i>	MA	+++
Ponto 4	I'4	P4C4	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/TOB/IMI/ETP/MER	<i>aacc2</i>	<i>fimH/kfuBC</i>	FDA	+++
Urina	I'4	B19	CTX/CRO/CAZ/CPM/GEN/KAN/TOB/CIP/NOR	<i>bla<sub>TEM</sub>/bla<sub>CTX-M</sub></i>	<i>fimH/mrkD</i>	FDA	+++

## APENDICE A – Artigo publicados

Biomédica 2019;39(Supl.1):195-49  
doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i0.4991>

Original article

### Detection of multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from river waters flowing to the Guanabara Bay and from clinical samples of hospitals in Rio de Janeiro, Brazil

Verônica Dias Gonçalves<sup>1</sup>, Frederico Meirelles-Pereira<sup>2</sup>, Márcio Cataldo<sup>1</sup>, Bianca de Oliveira Fonseca<sup>1</sup>, Barbara Araujo Nogueira<sup>1</sup>, Julianna Giordano Botelho Olivella<sup>1</sup>, Francisco de Assis Esteves<sup>2</sup>, Ana Luiza Mattos-Guaraldi<sup>1</sup>, Arnaldo Feitosa Braga de Andrade<sup>1</sup>, Alexandre Ribeiro Bello<sup>1</sup>, José Augusto Adler Pereira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Limnologia, Departamento de Ecologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

**Introduction:** The use of antibiotics in humans, animal husbandry and veterinary activities induces selective pressure leading to the colonization and infection by resistant strains.

**Objective:** We evaluated water samples collected from rivers of the Guanabara Bay, which have suffered minor and major environmental degradation, and clinical samples of hospital origin to detect evidence of the presence of resistance genes to aminoglycosides, beta-lactam antibiotics and fluoroquinolones in strains of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* and *Escherichia coli*.

**Materials and methods:** For isolation of the water strains we employed culture media containing 32 µg/ml cephalotin and 8 µg/ml gentamicin. The strains from clinical materials were selected using culture media containing 8 µg/ml gentamicin. The strains were identified and subjected to antimicrobial susceptibility testing (AST), plasmid DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) to detect genes encoding enzymes modifying aminoglycosides (EMA), extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and plasmid mechanisms of quinolone resistance (PMQR).

**Results:** The AST of the isolates recovered from water samples showed multidrug-resistance profiles similar to those found in isolates recovered from clinical materials. All isolates from water samples and 90% of the isolates from clinical samples showed at least one plasmid band. In the PCR assays, 7.4% of the isolates recovered from water samples and 20% of those from clinical materials showed amplification products for the three antimicrobial classes.

**Conclusion:** We believe that the detection of microorganisms presenting genetic elements in environments such as water is necessary for the prevention and control of their dissemination with potential to infect humans and other animals in eventual contact with these environments.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*; *Escherichia coli*; drug resistance, multiple; plasmids; waste water; Brasil.

**Received:** 05/04/19

**Accepted:** 24/10/19

**Published:** 19/12/19

**Citation:**

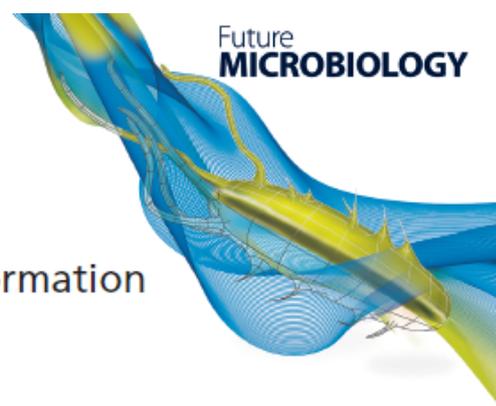
Dias-Gonçalves V, Meirelles-Pereira F, Cataldo M, de Oliveira-Fonseca B, Araujo-Nogueira B, Botelho-Olivella JG, et al. Detection of multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from river waters flowing to the Guanabara Bay and from clinical samples of hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. Biomédica. 2019;39(Supl.1):195-49  
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i0.4991>

**Corresponding author:**

Verônica Dias Gonçalves, Departamento de Microbiologia, Imunologia y Parasitologia, Facultad de Ciencias Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. Professor Manuel de Abreu, 444/3<sup>a</sup>

Research Article

For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)



## Influence of antibiotics on biofilm formation by different clones of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus*

Paula MA Pereira-Ribeiro<sup>‡,1</sup>, Bruna R Sued-Karam<sup>‡,1</sup>, Yuri V Faria<sup>1</sup>, Barbara A Nogueira<sup>1</sup>, Sabrina S Colodette<sup>1</sup>, Sérgio EL Fracalanza<sup>2</sup>, José LMB Duarte<sup>1</sup>, Raphael H Júnior<sup>1</sup> & Ana L Mattos-Guaraldi<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (FCM/UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro (CCS/UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

\*Author for correspondence: Fax: +55 212 868 8376; [aguaraldi@gmail.com](mailto:aguaraldi@gmail.com)

<sup>‡</sup>Authors contributed equally

*Staphylococcus haemolyticus* is the most common organism among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci. **Aim:** This study evaluated the ability to produce biofilm with the presence of the antibiotics (1/4 minimum inhibitory concentrations) of *S. haemolyticus* strains isolated from blood culture. **Methods:** Clonal distribution was assessed in pulsed-field gel electrophoresis. PCR assays were performed to detect *mecA*, *icaA*, *aap*, *atlE*, *atl*, *fbp* genes. *S. haemolyticus* strains grown in the presence of the antibiotics were investigated for biofilm formation on glass, polystyrene and catheter surfaces. **Results:** Biofilm formation was independent of the presence of the *icaA* and *mecA* genes, pulsed-field gel electrophoresis type. Vancomycin, oxacillin, moxifloxacin, rifampicin, teicoplanin, tigecycline and linezolid did not inhibit biofilm formation on abiotic surfaces. **Conclusion:** This study demonstrated that the biofilm formation process is complex and may not be related to *ica* gene carriage. Furthermore, in this study the biofilm formation was increased in the presence of antimicrobial agents.

First draft submitted: 15 August 2018; Accepted for publication: 29 November 2018; Published online: 4 July 2019

**Keywords:** antimicrobial agents • bacteremia • biofilm • PFGE • resistance • *Staphylococcus haemolyticus*

## Biofilm Formation on Breast Implant Surfaces by Major Gram-Positive Bacterial Pathogens

Gabriel Rezende-Pereira, MSc; Julia P. Albuquerque, PhD; Monica C. Souza, PhD; Barbara A. Nogueira, PhD; Marlei G. Silva, BS; Raphael Hirata Jr, PhD; Ana L. Mattos-Guaraldi, PhD; Rafael S. Duarte, MD, PhD; and Felipe P.G. Neves, PhD\*

Aesthetic Surgery Journal  
 2021, 51–8  
 © 2020 The Aesthetic Society.  
 Reprints and permission:  
 journals.permissions@oup.com  
 DOI: 10.1093/asj/sjz416  
 www.aestheticsurgeryjournal.com

OXFORD  
 UNIVERSITY PRESS

### Abstract

**Background:** Bacterial biofilm on surfaces of mammary implants is a predisposing factor for several outcomes. Because Gram-positive bacteria are potential agents of biomaterial-associated infections (BAIs), their abilities to form biofilm on breast implants should be elucidated.

**Objectives:** The aim of this study was to evaluate biofilm formation on different mammary prosthesis surfaces by major Gram-positive bacterial pathogens involved in BAIs.

**Methods:** We initially evaluated biofilm formation on polystyrene plates with and without fibrinogen or collagen for 1 reference strain and 1 clinical isolate of *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Streptococcus pyogenes*. We also tested the ability of clinical isolates to form biofilm on 4 different implant surfaces: polyurethane foam and smooth, microtextured, and standard textured silicone. Biofilm structure and cell viability were observed by scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy.

**Results:** All strains showed strong biofilm formation on polystyrene. After fibrinogen or collagen treatment, biofilm formation varied. With fibrinogen, reference strains of *S. aureus* and *S. pyogenes* increased biofilm formation ( $P < 0.05$ ). Reference strains of all species and the clinical isolate of *S. pyogenes* increased biofilm formation after collagen treatment ( $P < 0.05$ ). In general, *S. aureus* showed higher capacity to produce biofilm. Scanning electron microscopy showed that biofilm attached to all surfaces tested, with the presence of extracellular polymeric substances and voids. Viable cells were more frequent for *E. faecalis* and *S. pyogenes*.

**Conclusions:** All species produced biofilm on all prosthesis surfaces and under different conditions. Micrographies indicated thicker bacterial biofilm formation on microtextured and/or standard textured silicone by all species, except *E. faecalis*.

Editorial Decision date: October 2, 2020; online publish-ahead-of-print December 30, 2020.

Mr Rezende-Pereira is a student, Dr Albuquerque is an adjunct professor, and Dr Neves is an associate professor, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil. Dr Nogueira is a doctoral fellow, Dr Souza is a postdoctoral fellow, and Drs Hirata Jr (in memoriam) and Mattos-Guaraldi are Associate Professors, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Dr Silva is a laboratory technician and Dr Duarte is an associate professor, Instituto de

Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

### Corresponding Author:

Dr Felipe Piedade Gonçalves Neves, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Rua Professor Hernani Melo, 101 São Domingos, 24210-130, Niterói, RJ, Brazil.

E-mail: fpgneves@id.uff.br; Instagram: @felipe\_piedade\_g\_neves

## *Staphylococcus aureus* biofilms: an opportunistic pathogen with multidrug resistance

Giorgio Silva-Santana<sup>a,d</sup>, Guilherme Goulart Cabral-Oliveira<sup>b,d</sup>,  
Dryelle Rodrigues Oliveira<sup>c,d</sup>, Barbara Araújo Nogueira<sup>c,d</sup>,  
Paula Marcele Afonso Pereira-Ribeiro<sup>c,d</sup>  
and Ana Luíza Mattos-Guaraldi<sup>a,b,c,d</sup>

Studies related to bacterial biofilm formation are extremely relevant because of their constant association with several human diseases. The organization of this sessile microbial community provides protection against opsonization and phagocytosis. It is responsible for hampering not only the immune system performance against infections but also antimicrobial activity. *Staphylococcus aureus* is part of healthy human microbiota including skin and nasal vestibule. However, many strains have become opportunistic pathogens because of the ability of biofilm formation in implants and medical devices by using them as route of access to bloodstream. *S. aureus*' ability of biofilm formation is widely known and it has been responsible for several infections, such as endocarditis, bacteremia and sepsis. Several factors contribute to biofilm formation including expression of specific genes and interaction between proteins involved in adhesion to substrate. This work aims to explore the main aspects related to biofilm formation by *S. aureus*, using tools as data index bases from the scientific literature: Google Scholar, LILACS, MEDLINE (PubMed), SciELO, Scopus and Book/ eBook, between July 2018 and February 2019, in English, Spanish and Portuguese. This review aims to provide a better understanding of biofilm formation and its impact on host health.

Copyright © 2020 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Reviews in Medical Microbiology 2020, 31:000–000

**Keywords:** biofilm, opportunistic pathogen, *Staphylococcus aureus*, virulence

### Introduction

*Staphylococcus aureus* is part of Staphylococcaceae family [1], *Staphylococcus* genus and Gram-positive cocci group. This species is microbiologically characterized with a measurement of 0.5–1.5 µm in diameter, and is grouped as irregular clusters resembling to 'bunch of grapes' [2]. These are nonmotile, nonspore-forming and facultative anaerobes. In this genus, there are 33 species. Among them, 17 may be isolated from human biological materials [3,4]. The biochemical characteristics include catalase and

coagulase positive and both tests for mannitol deoxyribonuclease are also positive, these results might be used as identification method in laboratory [2,5]. Typical colonies are yellow in color – because of carotenoid pigments – smooth, slightly raised, and hemolytic (β-hemolysis) from the hemolysin production on 5% sheep blood agar [6]. The selective culture medium commonly used is salty-mannitol agar, composed of sugar D-mannitol and sodium chloride (NaCl). Its hypertonicity helps to select *Staphylococcus* genus and indicate species capable of fermenting D-mannitol [5].

<sup>a</sup>Health Sciences Center, Institute of Microbiology Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro; <sup>b</sup>Biomedical Center, <sup>c</sup>Microbiology, Immunology and Parasitology Department, College of Medical Sciences, University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; and <sup>d</sup>Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, College of Medical Sciences, University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; The Collaborating Centre for Reference and Research on Diphtheria/National Health Foundation/Ministry of Health, Brazil.

Correspondence to Giorgio Silva-Santana, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Cidade Universitária - Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Tel: +55 21 2560 8344; e-mail: bio.sant@hotmail.com

Received: 27 February 2020; revised: 4 March 2020; accepted: 11 March 2020

DOI:10.1097/RMM.0000000000000223

## APÊNDICE B – Capítulo de livro publicados

In: *Advances in Environmental Research* ISBN: 978-1-53617-488-5  
Editor: Justin A. Daniels © 2020 Nova Science Publishers, Inc.

*Chapter 6*

**DETECTION OF MULTIDRUG-RESISTANT  
*ESCHERICHIA COLI* STRAINS  
WITH VIRULENCE PATHOTYPES ISOLATED  
FROM URBAN RIVERS LOCATED AT RIO DE  
JANEIRO METROPOLITAN AREA, BRAZIL**

*Barbara Araújo Nogueira\*,  
Julianna Giordano Botelho Olivella,  
Bruna Ribeiro Sued-Karam, PhD,  
Guilherme Goulart Cabral-Oliveira,  
Cassius de Souza, PhD,  
Paula Marcele Afonso Pereira Ribeiro, PhD and  
Ana Luísa de Mattos-Guaraldi, PhD*  
Microbiology and Immunology Department,  
Rio de Janeiro State University  
Rio de Janeiro, Brazil

## CAPÍTULO 18

### ENTEROCOCCUS SP. ISOLADOS DE AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO JOANA LOCALIZADO NA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO

**Valmir Wellington Alves de Oliveira**

Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro –FCM/UERJ  
Campus João Uchoa, Universidade Estácio de Sá

**Bárbara Araújo Nogueira**

Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro –FCM/UERJ

**Bruna Ribeiro Sued Karam**

Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro –FCM/UERJ

**Julliana Giordano Botelho Olivella**

Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro –FCM/UERJ

**Paula Marcele Afonso Pereira Ribeiro**

Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro –FCM/UERJ

**Cecilia Maria Ferrelira da Silva**

Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro –FCM/UERJ

**Cassius Souza**

Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro –FCM/UERJ

**Raphael Hirata Jr**

Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro –FCM/UERJ

**Ana Luíza de Mattos Guaraldi**

Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro –FCM/UERJ

**RESUMO:** As doenças infecciosas têm como tratamento a utilização de antimicrobianos,

sendo o seu uso adequado uma das principais preocupações mundiais. Eles estão entre os fármacos mais prescritos, porém, mais de 50% das vezes são indicados sem necessidade. Atualmente, o uso indiscriminado dos antimicrobianos vem sendo considerado o terceiro maior problema de saúde pública, favorecendo o desenvolvimento de mecanismos de resistência e de disseminação de diversas espécies bacterianas comensais e patogênicas para humanos e animais. Os antimicrobianos são substâncias químicas produzidas por microrganismos ou de forma sintética, capazes de inibir o crescimento ou destruir as bactérias, baseando-se nos mecanismos de ação das células bacterianas e em sua estrutura química. Desde o início da utilização de antimicrobianos se tem conhecimento da possibilidade dos microrganismos desenvolverem mecanismos de resistência às drogas antimicrobianas. O uso prolongado dessas drogas pode, gradualmente, gerar uma pressão seletiva, atuando como crivo para supostas vantagens microbianas que favorecem a persistência e a circulação nos ambientes. O aparecimento da resistência foi, é, e provavelmente continuará a ser, um dos grandes problemas tanto no ambiente nosocomial quanto comunitário, já que é causada pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética. Nos ecossistemas terrestres e

**APÊNDICE C – Artigos submetidos**

## Brazilian Journal of Microbiology

### Multidrug-resistance and virulence-related properties of diarrheagenic *Escherichia coli* in urban river: a possible source and dissemination of human infections

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	BJMI-D-21-00092R1	
<b>Full Title:</b>	Multidrug-resistance and virulence-related properties of diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> in urban river: a possible source and dissemination of human infections	
<b>Article Type:</b>	Research Paper	
<b>Funding Information:</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Not applicable
<b>Abstract:</b>	<p>The presence of multi-drug resistant (MDR) <i>E. coli</i> harboring virulence pathotypes in aquatic systems is a public health concern due to an increase number of cases of infections and outbreaks in industrialized and developing countries. The aim of the present study was to evaluate the microbiological quality of Joana river, located at Rio de Janeiro, by analyzing <i>E. coli</i> bacteria contamination and to investigate virulence properties and MDR profiles by phenotypic and genotypic methods, including bacterial interaction with Caco-2 cells. A total of 34 <i>E. coli</i> were identified by MALDI-TOF and 20 <i>E. coli</i> were characterized as MDR when submitted to antimicrobial susceptibility test. Evaluation by multiplex-PCR of MDR <i>E. coli</i> demonstrated the presence of virulence pathotypes: EHEC ( <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> genes), STEC ( <i>stx2</i> gene) and EIEC/STEC ( <i>stx2</i> , <i>ial</i> genes). Virulence potential was demonstrated by the ability to adhere and survive within Caco-2 cells of MDR <i>E. coli</i> pathotypes (n=4). In conclusion, this study demonstrates the presence of diarrheagenic MDR <i>E. coli</i> in river water at Rio de Janeiro. The possibility of aquatic environment dissemination of antimicrobial resistance and human contamination leading to community and nosocomial infections due to virulent MDR <i>E. coli</i> water-borne pathogens is a matter of concern.</p>	
<b>Corresponding Author:</b>	Barbara Araújo Nogueira, Msc Universidade do Estado do Rio de Janeiro BRAZIL	
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>		
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade do Estado do Rio de Janeiro	
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>		
<b>First Author:</b>	Barbara Araújo Nogueira, Msc	

## Journal of Urban Health

### Enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from urban rivers and their virulence potential in epithelial human cells --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>					
<b>Full Title:</b>	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> isolated from urban rivers and their virulence potential in epithelial human cells				
<b>Article Type:</b>	Original Research				
<b>Keywords:</b>	Enteropathogenicity; <i>Escherichia coli</i> ; cell interaction; virulence factors; adherence; invasion; persistence				
<b>Corresponding Author:</b>	Ana Lúza Mattos-Guaraldi, Ph.D. Universidade do Estado do Rio de Janeiro Faculdade de Ciências Médicas BRAZIL				
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>					
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade do Estado do Rio de Janeiro Faculdade de Ciências Médicas				
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>					
<b>First Author:</b>	Barbara Araujo Nogueira				
<b>First Author Secondary Information:</b>					
<b>Order of Authors:</b>	Barbara Araujo Nogueira Juliana Giordano Botelho Oliveira Bruna Ribeiro Sued Karam Paula Marcelo Afonso Pereira Ribeiro Ana Claudia de Paula Rosa Ignácio Ana Lúza Mattos-Guaraldi, Ph.D.				
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>					
<b>Funding Information:</b>	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 60%;">Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior</td> <td>Mac Barbara Araujo Nogueira</td> </tr> <tr> <td>Universidade do Estado do Rio de Janeiro</td> <td>Mac Barbara Araujo Nogueira</td> </tr> </table>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Mac Barbara Araujo Nogueira	Universidade do Estado do Rio de Janeiro	Mac Barbara Araujo Nogueira
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Mac Barbara Araujo Nogueira				
Universidade do Estado do Rio de Janeiro	Mac Barbara Araujo Nogueira				
<b>Abstract:</b>	<p>Multidrug-resistant (MDR) <i>Escherichia coli</i> may be related to the presence of virulence gene. To cause infections, pathogenic <i>E. coli</i> interact with the mucosa by attaching and/or invading the target host cells. Bacterial adhesion is an important step to the colonization of gastrointestinal human tract while epithelial cell invasion is a virulence factor key. This paper investigated the ability of adherence, intracellular survival and persistence in intestinal cell line (Caco-2) of MDR <i>E. coli</i> harboring virulence factors. A total of 20 <i>E. coli</i> presented resistance to three or more antimicrobial agents of interest and were classified as multidrug-resistant. MDR <i>E. coli</i> isolates were characterized as EHEC, STEC and EIEC and were investigated for adherence, intracellular survival and persistence abilities in CACO-2 cells. In conclusion, this paper demonstrates the diversity of pathotypes of MDR <i>E. coli</i> isolated in urban river at Rio de Janeiro metropolitan area and their ability to infect human cells causing infections difficult to treat.</p>				

## ANEXO D – Artigo submetido com resultados complementares a tese

**MOLGENZ110027NOGUEIRA**

**Biofilm formation, interaction and survival within A549 pneumocytes of *Klebsiella pneumoniae* clinical strains: identification of pulsotypes, multidrug-resistance and genes coding for adhesins**

MGMV Molecular Genetics, Microbiology and Virology

Original Version

[Show Submitted Files](#)

Peer Review Process: **Single Blind**

**Biofilm formation, interaction and survival within A549 pneumocytes of *Klebsiella pneumoniae* clinical strains: identification of pulsotypes, multidrug-resistance and genes coding for adhesins**

Received Date: 16 May 2021

**METADATA**

Title:

Biofilm formation, interaction and survival within A549 pneumocytes of *Klebsiella pneumoniae* clinical strains: identification of pulsotypes, multidrug-resistance and genes coding for adhesins

Abstract:

*Klebsiella pneumoniae* has become one of the major causes of hospital-acquired infections over decades due to the spread of virulent clones harboring resistant genes to multiple antimicrobial agents. The aim of this study was to investigate phenotypic and genotypic features of virulence mechanism expressed by *K. pneumoniae* clinical isolates of different PFGE types, including biofilm formation, interaction with pneumocytes A549 lineage and experimental infection by using *C. elegans* nematodes. A total of 17 *K. pneumoniae* strains were isolated from different clinical specimens including blood, urine and respiratory infections. In this present study, 11 strains presented a varied multidrug-resistance profile harboring resistance genes coding for betalactams, aminoglycosydes, fluoroquinolones and carbapenemases. PFGE analysis demonstrated the presence of four distinct pulsotypes among *K. pneumoniae* strains harboring virulence genes for siderophores and fimbriae type 1 and type 3. High adherence and biofilm formation were positively correlated for both polystyrene and glass surfaces in all *K. pneumoniae* strains analyzed. *K. pneumoniae* clinical strains showed the ability of adherence, internalization and persistence within human pulmonary epithelial A549 cell line, at different levels. Respiratory infections demonstrated a higher heterogeneity of PFGE types and levels of adherence, intracellular survival and persistence. *K. pneumoniae* strains were also submitted to *Caenorhabditis elegans* in vivo infection model and data showed that after 24 hr almost 10% of urine-culture isolates worms were dead evidencing virulence profile. Notably, *K. pneumoniae* strains, presenting virulence genes, was significantly more virulent than those who did not presented any virulence gene after 5 days (survival >60% and >40%).

Author Details:

**1** First Author

Barbara Nogueira Corresponding Author

Email: babinogueira@hotmail.com

Affiliation(s):