

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

**Disseminação de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente:
produção de biofilme, avaliação da virulência e do *fitness* bacteriano
em amostras clínicas produtoras de KPC**

Paola Amaral de Campos

Uberlândia – MG
Março - 2017

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

**Disseminação de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente:
produção de biofilme, avaliação da virulência e do *fitness* bacteriano
em amostras clínicas produtoras de KPC**

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

Orientadora:

Profª. Dra. Rosineide Marques Ribas.

Paola Amaral de Campos

Uberlândia – MG
Março - 2017

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

- C198d
2017 Campos, Paola Amaral de, 1989
Disseminação de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente: produção de biofilme, avaliação da virulência e do fitness bacteriano em amostras clínicas produtoras de KPC / Paola Amaral de Campos. - 2017.
97 f. : il.
- Orientadora: Rosineide Marques Ribas.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. Biofilme - Teses. 3. Carbapenêmicos - Teses. 4. Infecção hospitalar - Teses. I. Ribas, Rosineide Marques, 1974- . II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.



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



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Paola Amaral de Campos

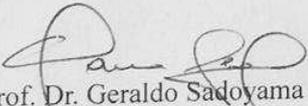
“Disseminação de *K. pneumoniae* multirresistente: produção de biofilme, avaliação da virulência e do fitness bacteriano em amostras clínicas produtoras de KPC”

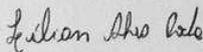
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

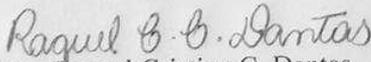
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

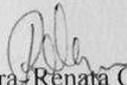
Banca Examinadora:

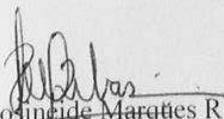
Uberlândia, 13 de março de 2017.


Prof. Dr. Geraldo Sadoyama Leal
UFG/Catalão


Dra. Lílian Alves Rocha
Hosp. De Base do Distrito Federal


Dra. Raquel Cristina C. Dantas
PÓS-DOC/PPGEQ-UFU


Profa. Dra. Renata Cristina Cezário
IMEPAC/Araguari


Profa. Dra. Rosângela Marques Ribas – orientadora
ICBIM/UFU

*Dedico este trabalho, com muito carinho,
aos meus pais, **Paulo e Milene**,
incentivadores incansáveis dos meus estudos,
que me deram apenas duas instruções:
ser uma pessoa boa e feliz.*

*“ Procure descobrir o seu caminho na vida.
Ninguém é responsável pelo nosso destino,
a não ser nós mesmos. ”*

[Chico Xavier]

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Primeiramente a **Deus**, fonte inesgotável de esperança, por me fazer forte e perseverante. Agradeço pela proteção ininterrupta e por sempre iluminar meu caminho com oportunidades, desafios e amigos preciosos.

Aos meus pais, **Paulo e Milene**, meu infinito agradecimento. Obrigada pela dedicação e amor com que me criaram, sempre investindo na minha formação e acreditando no meu potencial.

Valorizo também o apoio e afeto da minha irmã **Larissa**, dos meus familiares e amigos de longa data, que sempre torceram para que eu alcançasse meus objetivos.

Ao meu namorado **Rodolpho**, por entender as minhas faltas, pelo companheirismo e horas de incentivo. Obrigada por ser meu melhor amigo e confidente.

À Prof.^a Dra. **Rosineide Marques Ribas**, por ter acreditado em mim e caminhado comigo passo a passo, transmitindo os segredos desta caminhada. Agradeço por me acompanhar por tantos anos, desde a iniciação científica, sendo um exemplo de dedicação e doação à pesquisa científica e à docência. Meu respeito e admiração.

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

Aos meus colegas de profissão e de vida, a todos do Laboratório de Microbiologia Molecular (UFU), **Ana Paula, Bruna, Daiane, Deivid, Iara, Luiz Gustavo e Melina**, pelo apoio moral e prático durante toda essa jornada, pelas sugestões e recomendações para as apresentações deste trabalho, e principalmente, por se tornarem a minha família em Uberlândia. **Sabrina**, por todo trabalho conjunto neste doutorado, agradeço sua amizade e parceria.

À Dra. **Lizandra Ferreira de Almeida e Borges** por ter gentilmente cedido duas amostras de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos isoladas no Hospital Municipal de Uberlândia, incluídas neste trabalho.

Aos técnicos do laboratório **Cristiane, Lícia, Claudete e Ricardo** pela amizade, auxílio e colaboração.

Às secretárias da coordenação do PPIPA, **Lucélia e Lucileide** pelo esclarecimento de todas as dúvidas, pela atenção e paciência.

Agradeço aos integrantes da minha banca Dr. **Geraldo Sadoyama Leal**, Dra. **Lílian Alves Rocha**, Dra. **Renata Cristina Cezário** e Dra. **Raquel Cristina Cavalcanti Dantas** por aceitarem participar da minha defesa e pelo muito que vão acrescentar ao meu trabalho e colaborar com o meu desenvolvimento.

Aos professores que participaram da minha banca de qualificação, Dra. **Juliana Pena Porto**, Dra. **Helisângela de Almeida Silva** e Dr. **Jair Pereira da Cunha Junior**, pelas grandes contribuições no artigo publicado e no projeto de pós-doutorado.

Aos profissionais de saúde do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia; à equipe do Laboratório de Microbiologia, particularmente à MSc. **Vivieni Vieira Prado Almeida**; à equipe do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar; aos funcionários do Setor de Registros Médicos e à farmacêutica **Simone Franco Osme** por toda ajuda prestada.

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

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, particularmente ao Dr. **Rafael Heilbuth** pelas análises de MEV.

Aos pesquisadores que cederam gentilmente as amostras controle utilizadas neste trabalho: Dra. **Claire Hennequin** (Chermont Université, França), Dra. **Doroti de Oliveira Garcia** (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo), Dr. **Carlos Martins** (Universidade de Franca), Dr. **Octávio Luiz Franco** (Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília) e Dra. **Ila Fernanda Nunes Lima** (Universidade Federal do Ceará).

Agradeço também aos **pacientes**... sem eles o trabalho não seria possível!

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)**, pela concessão de uma bolsa de estudos com a qual foi possível dedicação exclusiva ao doutorado.

A todos que, direta ou indiretamente, permitiram que este sonho se concretizasse.

Muito obrigada !!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	11
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS	15
RESUMO	16
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Amostras bacterianas e desenho do estudo.....	31
3.2. Identificação das espécies.....	31
3.3. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	32
3.4. Disco difusão	32
3.5. Definições.....	33
3.6. Comitê de Ética	34
3.7. Técnicas Moleculares	35
3.7.1. Extração do DNA genômico.....	35
3.7.2. Detecção dos genes de resistência por PCR	35
3.7.3. Detecção dos genes de virulência <i>ecpA</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>rmpA</i> , <i>fimH</i> , <i>iucC</i> , <i>khe</i> e <i>mrkD</i>	36
3.7.4. Avaliação da similaridade genética pela técnica de <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE) e interpretação dos padrões moleculares	37
3.7.5. Caracterização das amostras bacterianas utilizando sequências de fragmentos internos: MLST (<i>Multilocus Sequence Typing</i>).....	38
3.7.6. Purificação e sequenciamento dos genes <i>bla_{KPC}</i> e <i>housekeeping</i>	39
3.8. Avaliação da produção de biofilme	40
3.8.1. Preparação do inóculo bacteriano	40
3.8.2. Ensaio de adesão a superfície inerte	40
3.8.3. Contagem de células viáveis no biofilme	41
3.8.4. Produção de biomassa.....	41
3.8.5. Classificação do biofilme.....	42
3.8.6. Formação de biofilme em esferas de vidro e análise por MEV	42
3.9. Determinação do <i>fitness</i> bacteriano	43
3.9.1. Experimentos de competição de crescimento <i>in vitro</i>	43
3.10. Análise Estatística.....	Erro! Indicador não definido.
4. RESULTADOS	45
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES.....	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXO I.....	94
ANEXO II.....	95
APÊNDICE I.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

β	Beta
<	Menor
>	Maior
\leq	Maior ou igual
\geq	Menor ou igual
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
μg	Microgramas
μL	Microlitro
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> ; Coleção de Cultura do Tipo Americana
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> ; Infusão de Cérebro-Coração
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ; Ferramenta de Alinhamento de Busca Local
CCIH	Controle de Infecção Relacionadas à Assistência à Saúde
CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i> ; Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i> ; Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
CTX-M	Referência à enzima que hidrolisa preferencialmente cefotaxima
DDD	<i>Defined Daily Dose</i> ; Dose Diária Definida
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> ; Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	<i>Deoxynucleoside Triphosphate</i> ; Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> ; Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ; Ácido etileno-diamino tetracético
ESBL	<i>Extended-spectrum β-lactamase</i> ; β -lactamases de amplo espectro
et al	E colaboradores
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
IC	Índice de Competição
Kp	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
KpRC	<i>K. pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos
KpSC	<i>K. pneumoniae</i> sensível aos carbapenêmicos
LPS	Lipopolissacarídeos
MDR	<i>Multidrug-Resistant</i> , Multirresistente
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MH	Müeller-Hinton
mL	Mililitro
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i> ; Tipagem por sequenciamento de multilocus
MYSTIC	<i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection</i> ; Coleção de Informações dos testes anuais de Susceptibilidade do Meropenem
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> ; Centro Nacional de Informação Biotecnológica
OMPs	<i>Outer membrane proteins</i> ; Proteínas de membrana externa
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>p</i>	Valor de <i>p</i>
pb	Pares de base

PBPs	<i>Penicillin-binding proteins</i> ; Proteínas ligadoras de penicilina
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> ; Tampão fosfato-salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> ; Eletroforese em gel de campo pulsado
χ^2	Qui-Quadrado
SD	<i>Standard Deviation</i> ; Desvio Padrão
SENTRY	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i> ; Programa de vigilância antimicrobiana
SHV	<i>Sulphydryl variable</i> ; Variável sulfidril
SLV	<i>Single Locus Variant</i> ; Variantes de loco único
STs	<i>Sequence Types</i> ; Tipos de Sequências
TBE	<i>Tris, Borate and EDTA</i> ; Tris, Ácido bórico e EDTA
TE	Tris e EDTA
TEM	Temoriana
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i> ; Ágar Triptona de Soja
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> ; Caldo Triptona de Soja
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages</i> ; Uso de grupos pares não ponderados utilizando médias aritméticas
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTI-HM	Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Municipal de Uberlândia
WHO	<i>World Health Organization</i> ; Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Organograma referente aos pacientes com infecções e colonizações por *Klebsiella pneumoniae* resistentes às cefalosporinas de amplo espectro e/ou carbapenêmicos.....45
- Figura 2:** Curva de sobrevivência dos pacientes infectados por *K. pneumoniae* que receberam terapia antimicrobiana inapropriada em relação ao grupo que recebeu terapia apropriada, considerando mortalidade em 30 dias.....48
- Figura 3.** Dose diária definida dos antimicrobianos por 1000 pacientes-dia no HC-UFU no período de 2009 a 2016 e a correlação com as taxas de ESBL e KPC.....56
- Figura 4.** Dendrograma gerado por análise computadorizada de perfis clonais de DNA de 36 amostras clínicas de *K. pneumoniae* baseado na eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). A análise foi realizada pelo método de Dice/UPGMA (similaridade $\geq 85\%$).....57
- Figura 5.** Diagrama construído através do goeBURST (PHYLOVIZ Online) indicando a similaridade entre os STs.....58
- Figura 6:** Avaliação do número de células aderidas, formação de biofilme e biomassa em 10 amostras de *K. pneumoniae*.....61
- Figura 7.** Microscopia eletrônica de varredura da formação de biofilmes da amostra clínica de *K. pneumoniae* Kp30, desenvolvidos na superfície de esferas de vidro após 24 horas de incubação.....62
- Figura 8.** Microscopia eletrônica de varredura da formação de biofilmes da amostra clínica de *K. pneumoniae* KPC 05, desenvolvidos na superfície de esferas de vidro após 24 horas de incubação.....63
- Figura 9:** Custos do *fitness* bacteriano.....64

LISTA DE TABELAS

Quadro 1. Cepas-controle que foram utilizadas nos experimentos.....	31
Quadro 2. Reagentes para realização da Reação em Cadeia da Polimerase.....	35
Quadro 3: <i>Primers</i> para amplificação dos genes de resistência das amostras de <i>K. pneumoniae</i> por Reação em Cadeia da Polimerase.....	36
Quadro 4: <i>Primers</i> para amplificação dos genes de virulência das amostras de <i>K. pneumoniae</i> por Reação em Cadeia da Polimerase.....	37
Quadro 5: <i>Primers</i> utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes <i>housekeeping</i> para análise por <i>Multilocus Sequence Typing</i>	39
Quadro 6. Critérios para classificação da produção de biofilme.....	42
Tabela 1. Características clínicas e demográficas de pacientes colonizados e infectados por <i>Klebsiella pneumoniae</i> sensível e resistente aos carbapenêmicos, recuperadas de pacientes hospitalizados.....	46
Tabela 2. Caracterização das amostras de <i>K. pneumoniae</i> quanto a data do isolamento, clínica, evolução clínica do paciente, sítio de isolamento, perfil de resistência e fenótipo de multirresistência.....	49
Tabela 3. Caracterização das cepas clínicas de <i>K. pneumoniae</i> sensíveis e resistentes aos carbapenêmicos com base em características genotípicas relacionadas à resistência e virulência.....	53
Tabela 4. Média da somatória do consumo de antibióticos em DDD/1000 pacientes-dia para: imipenem, meropenem, cefepime, ceftriaxona, ciprofloxacino, levofloxacino e polimixina B no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, nos anos de 2009 a 2016.....	56
Tabela 5. Alelos dos STs das amostras de <i>K. pneumoniae</i> sensíveis e resistentes aos carbapenêmicos.....	59
Tabela 6. Produção de biofilme, multirresistência e perfil genético das amostras de <i>K. pneumoniae</i>	60

RESUMO

Klebsiella pneumoniae é um agente etiológico frequente em infecções relacionadas à assistência à saúde no Brasil e possui uma grande capacidade de desenvolver ou adquirir resistência aos antimicrobianos. Este estudo investigou a disseminação clonal e os tipos de sequência (STs) predominantes em amostras clínicas de *K. pneumoniae* apresentando genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC}, bem como a presença de genes para fatores de virulência e a capacidade de produção de biofilmes. Adicionalmente, também foi examinado o impacto das resistências aos carbapenêmicos e polimixina no *fitness* bacteriano de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase (KPC). Para as avaliações epidemiológicas foram selecionadas aleatoriamente 60 amostras não-duplicadas de *K. pneumoniae*, sendo 30 amostras de infecção *K. pneumoniae* sensível aos carbapenêmicos (KpSC), 20 infecções e 10 colonizações por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (KpRC). As amostras foram selecionadas a partir de uma coleção recuperada de pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) no período de junho de 2009 a julho de 2015. Para investigação dos genes de resistência *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC} e genes de virulência *fimH*, *fimA*, *wabG*, *iucC*, *rmpA*, *ecpA*, *mrkD* e *khe*, as amostras foram avaliadas por reação em cadeia da polimerase (PCR). A confirmação de *bla*_{KPC-2} foi realizada por sequenciamento genético. Os pulsotipos, STs e complexos clonais foram determinados por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e *Multilocus Sequence Typing* (MLST). A adesão inicial e a formação de biofilme foram examinadas por ensaios quantitativos, e os resultados confirmados por microscopia eletrônica de varredura. Para avaliação do *fitness* foram utilizados experimentos de competição em pares, *in vitro*, utilizando três amostras de *K. pneumoniae*: uma resistente aos carbapenêmicos, contendo 5 dos 8 genes de virulência avaliados, uma resistente aos carbapenêmicos e polimixina, menos virulenta, e a amostra ATCC 10031 multissensível. Diferenças importantes foram encontradas na caracterização dos grupos KpSC e KpRC, destacando-se o elevado uso prévio de β -lactâmicos (53%), carbapenêmicos (73,3%) e polimixina B (43,3%) naqueles infectados por amostras resistentes. A terapia inadequada embora tenha sido prevalente em 56,7% dos casos, foi bem maior (70%) entre pacientes com infecções por KpRC. No total, 75% das amostras foram caracterizadas como multirresistentes. Além disso, foi observado alto consumo em DDD de cefepime, ceftriaxona e carbapenêmicos, com tendência ascendente entre o início e o final do período estudado. Em relação à presença de genes de resistência, 80% das amostras apresentaram o gene *bla*_{CTX-M} e 100% das amostras com resistência aos carbapenêmicos possuíam o gene *bla*_{KPC}. Os genes de virulência foram detectados com frequências elevadas em ambos os grupos, sem relação com a resistência aos carbapenêmicos. Entretanto, entre as amostras de KpRC, os genes *fimH*, *fimA* e *wabG* foram predominantes (83%). Observou-se disseminação policlonal das amostras com predominância dos STs 11 e 340, pertencentes ao complexo clonal 258. Todas as amostras de *K. pneumoniae* avaliadas foram capazes de aderir a uma superfície de poliestireno não modificada. No entanto, a análise estatística evidenciou que três amostras apresentaram taxas de adesão notavelmente mais altas do que as demais ($p < 0.001$). Comparados ao controle, todas as amostras apresentaram a habilidade de produzir biofilme, sem diferenças significativas. No

entanto, a avaliação da biomassa por cristal violeta evidenciou que 60% das amostras eram produtoras fracas de biofilme, resultado confirmado pela microscopia eletrônica de varredura. De acordo com os resultados do *fitness*, observou-se que a amostra resistente à polimixina apresentou taxas de crescimento mais significativas ($p=0,030$) e na competição entre as duas amostras clínicas multirresistentes, a amostra resistente ao carbapenêmico mostrou custo de *fitness* significativamente menor quando comparado à amostra resistente aos carbapenêmicos e à polimixina. O conhecimento dos fatores de virulência e o potencial patogênico de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL e carbapenemases contribui para melhor compreensão da colonização, patogenicidade e persistência desses micro-organismos no ambiente hospitalar e pode fornecer ferramentas para melhorar o tratamento de infecções graves, assim como subsídios para aprimorar as medidas de controle e prevenção de infecções.

Palavras-chave: policlonalidade, multirresistência, carbapenêmicos, virulência, biofilmes bacterianos, aptidão biológica

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is often involved with healthcare-associated infections (HAI) in Brazil, and has a great ability to develop or acquire antimicrobial resistance. This study investigated the clonal dissemination and prevalence of sequence types (STs) in clinical strains of *K. pneumoniae* carrying *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC} genes, as well as the presence of genes encoding virulence factors and the ability of these strains to produce biofilms. In addition, the impact of carbapenem and polymyxin-resistance on bacterial fitness of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (KPC) strains was also examined. We randomly selected non-duplicated *K. pneumoniae* isolates from a collection recovered from inpatients at the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia (HC-UFU) from June 2009 to July 2015. The study included broad-spectrum cephalosporin and/or carbapenems-resistant strains. For investigation of the *bla*_{CTX-M} and *bla*_{KPC} resistance genes and its association with virulence genes (*fimH*, *fimA*, *wabG*, *iucC*, *rmpA*, *ecpA*, *mrkD* e *khe*), the strains were evaluated by PCR. DNA sequencing was performed to confirm the presence of *bla*_{KPC-2} gene. The pulsotypes, STs and clonal complexes (CCs) were determined by PFGE and MLST, respectively. Initial adhesion and biofilm formation were examined by quantitative assays and the results confirmed by scanning electron microscopy. For fitness evaluation, *in vitro* pairwise competition experiments were carried out using three strains of *K. pneumoniae*: one resistant to carbapenem, harboring 5 of the 8 evaluated virulence genes, another less virulent, but resistant to carbapenem and polymyxin, and ATCC 10031 multisensitive strain. For epidemiological evaluations, sixty *K. pneumoniae* strains were randomly selected, of which 30 carbapenem-sensitive (KpSC) strains isolated from infections; 30 carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (KpRC) strains, 20 isolated from infections and 10 from colonizations. Significant differences were found when patients infected by KpSC and KpRC were compared, especially the high previous use of β -lactams (53%), carbapenems (73.3%) and polymyxin B (43.3%). Inadequate therapy, although prevalent in 56.7% of the patients, was much higher (70%) among those with KpRC infections. In total, 75% of the strains were characterized as multiresistant. Furthermore, we observed high consumption of cefepime, ceftriaxone and carbapenems by defined daily doses analysis, with an upward trend between the beginning and the end of the period of study. Regarding the presence of resistance genes, 80% of strains carried *bla*_{CTX-M} gene and 100% of carbapenem-resistant isolates the *bla*_{KPC-2} gene. Virulence genes were detected with high frequencies in both groups, unrelated to carbapenem resistance. However, among the KpRC strains, the *fimH*, *fimA* and *wabG* genes were predominant (83%). It was observed polyclonal dissemination of strains with predominance of MLST STs 11 and 340, belonging to the clonal complex 258. All *K. pneumoniae* strains evaluated could adhere to an unmodified polystyrene surface. However, the statistical analysis showed that three strains had remarkably higher adhesion rates than the others ($p < 0.001$). Compared to control, all strains had the ability to produce biofilm, without significant differences. However, the evaluation of biomass by crystal violet showed that 60% of the isolates were weak biofilm producers, results confirmed by scanning electron microscopy. According to the fitness results, the polymyxin-resistant strain was found to have more significant growth rates ($p = 0.030$) and, in competition experiments between the two multiresistant clinical strains, the carbapenem-resistant strain showed a significantly lower fitness cost when compared to the carbapenem and polymyxin-resistant strain. The knowledge

of the virulence factors and the pathogenic potential of ESBL and carbapenemases-producing *K. pneumoniae* contributes to a better understanding of colonization, pathogenicity and persistence of these microorganisms in the hospital environment and can provide tools to improve the treatment of serious infections as well as subsidies to improve infection control and prevention measures.

Key words: polyclonality, multiresistance, carbapenems, virulence, bacterial biofilms, fitness

1. INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos a emergência e disseminação de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em membros da família Enterobacteriaceae e outros bacilos Gram-negativos não fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* tornou-se um problema hospitalar significativo, principalmente pelo aumento de resistência a cefalosporinas de amplo espectro (3ª e 4ª gerações) e aos carbapenêmicos (PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010).

No gênero *Klebsiella*, *K. pneumoniae* é isolada com maior frequência nas amostras clínicas, causando infecções do trato urinário, pneumonia, infecções intra-abdominais, infecções de feridas cirúrgicas e bacteremia (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; BRISSE, GRIMON F, GRIMON P, 2006). Dados do estudo multicêntrico SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*), referentes ao período 1997-2001 para América Latina, mostraram que *K. pneumoniae* ocupa o 2º lugar tanto como causa de infecções urinárias em pacientes hospitalizados (10,35%) como de infecções adquiridas na comunidade (7%); e é o terceiro mais prevalente (9,8%) em infecções do trato respiratório inferior em pacientes hospitalizados (SADER et al., 2004). Dados de outro estudo multicêntrico MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*), referente a 2002 para o Brasil, em amostras de bacilos Gram-negativos obtidas de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva, indicam que *K. pneumoniae* é o terceiro germe mais isolado (12,1%), seguido de *Escherichia coli* (10,5%), *Enterobacter cloacae* (7,9%), *Serratia marcescens* (5,6%) e *Proteus mirabilis* (3,2%) (MENDES et al., 2005).

Os problemas relacionados a resistência aos β -lactâmicos em *K. pneumoniae* parecem ser mais importantes no Brasil e em outros países da América Latina do que em outras regiões do mundo (OLIVEIRA, 2008). Essa rápida emergência e disseminação de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos nos hospitais é um problema de grande proporção e as causas são multifatoriais, entretanto, as razões principais são claras: estão altamente correlacionadas com a pressão seletiva devido ao uso inapropriado de agentes antimicrobianos e a disseminação destes fenótipos é facilitada pela transmissão pessoa-a-pessoa devido à aplicação inconsistente de práticas básicas de prevenção e controle de infecções pelos profissionais de saúde (DYAR; PAGANI; PULCINI, 2015). No Brasil, essa questão é ainda mais significativa devido à alta densidade de uso de antibióticos, particularmente das classes

de β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos e fluorquinolonas (MOREIRA et al., 2013; PORTO et al., 2013; DANTAS et al., 2014).

Na tentativa de monitorar a emergência destas amostras resistentes, estudos têm explorado a relação entre o uso excessivo de antibióticos e a seleção de amostras resistentes aos antimicrobianos através da Dose Diária Definida (DDD) (HARBARTH et al., 2002; ONG et al., 2011). O DDD é considerado um bom marcador para avaliação do consumo de antimicrobianos e evita o viés do paciente número, permitindo comparar taxas de microorganismos e seus fenótipos de resistência. Adicionalmente, inúmeros estudos confirmam a relevância do número de DDD por 1000 pacientes-dia como uma unidade de medida para comparar uso de antimicrobianos entre países e regiões (MONNET et al., 2004).

É consenso que a resistência bacteriana tem sido um importante fator no aumento dos índices de mortalidade nos pacientes criticamente doentes (AZEVEDO, 2005), e que as infecções por germes resistentes vem aumentando expressivamente, tornando-se um problema de saúde pública, atraindo a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais como: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Organização Mundial de Saúde (OMS), CDC (*Centers for Diseases Control and Prevention*), associações de Controle de Infecção Relacionadas à Assistência à Saúde (CCIHs), além da indústria farmacêutica internacional (HAMBRAEUS, 2006). Neste contexto, destaca-se a importância clínica da *K. pneumoniae*, considerando seus níveis crescentes de resistência, relacionada à sua característica intrínseca de apresentar baixo nível de sensibilidade aos antimicrobianos e de carrear plasmídeos e outros elementos genéticos de resistência (LIVERMORE et al., 2002; LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

Dentre os principais mecanismos de resistência enzimáticos aos β -lactâmicos em *K. pneumoniae* estão: β -lactamases de amplo espectro (ESBL) e a produção de carbapenemases (BUSH; JACOBY, 2010). As enzimas ESBL pertencem a classe molecular A de Ambler e grupo funcional 2, subgrupo 2be de Bush, Jacoby e Medeiros (1995). Estas enzimas hidrolisam praticamente todos os β -lactâmicos, exceto as cefamicinas (cefotina e cefotetan) e os carbapenêmicos, sendo mediadas por genes plasmidiais não induzíveis e inibidas por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. As ESBL mais frequentemente encontradas pertencem às famílias SHV, TEM e CTX-M, as duas primeiras resultantes de mutações pontuais nos genes que codificam as respectivas β -lactamases de pequeno espectro (JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005).

As enzimas ESBL do tipo CTX-M são reconhecidas como uma família de ESBL de disseminação rápida, que preferencialmente hidrolisam cefotaxima ao invés de ceftazidima (BONNET, 2004; PATERSON et al., 2005; CANTÓN, COQUE, 2006). Além disso, são codificadas por genes *bla*_{CTX-M} localizados em plasmídeos, os quais podem albergar outros genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim, sulfonamidas e quinolonas (SCHWABER et al., 2005; MOROSINI et al., 2006). Estudos relatam alta frequência do gene *bla*_{CTX-M} entre amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL na América do Sul, Ásia e Europa (QUINTEROS et al., 2003; BONNET, 2004; LIVERMORE, HAWKEY, 2005; YAN et al., 2006). No Brasil, os primeiros relatos de uma enzima pertencente ao tipo CTX-M foram observados em amostras clínicas de enterobactérias coletadas em vários hospitais do Rio de Janeiro, entre 1996 e 1997 (BONNET et al., 2000).

Nos últimos anos, as enzimas ESBL da família CTX-M tiveram uma expansão acentuada, aumentando de 3% para 10% de todas as β -lactamases conhecidas entre 2000 e 2012, respectivamente (BUSH, 2013). No trabalho de Yan et al. (2006) em um hospital japonês, as taxas de produção de CTX-M foram muito altas, sendo detectadas em 58,5% das amostras de *K. pneumoniae*. No Brasil, também é ampla a diversidade de genótipos relacionados ao gene *bla*_{CTX-M} em *Klebsiella pneumoniae*, tendo sido detectado em diferentes hospitais do país (CHAGAS et al., 2011; SAMPAIO, GALES, 2016). A disseminação mundial dos genes que codificam essas enzimas ao longo dos últimos 25 anos é considerada um dos fenômenos mais rápidos e importantes em termos de resistência aos antibióticos (POIREL, BONNIN, NORDMANN, 2012) e até o momento, já foram identificadas 172 variantes de CTX-M em todo mundo (LAHEY CLINIC, 2017).

O aparecimento de enterobactérias multirresistentes produtoras de ESBL e também das β -lactamases AmpC de origem plasmidial levou a introdução de carbapenêmicos como opção no tratamento de infecções associadas a esse fenótipo (THOMSON, 2010). Os carbapenêmicos são antibióticos β -lactâmicos que entram nas células das bactérias Gram-negativas através das proteínas de membrana externa (OMPs), também conhecidas como porinas. Depois de atravessar o espaço periplasmático, os carbapenêmicos acilam permanentemente as PBPs, que são enzimas que catalisam a formação de peptidoglicano na parede celular de bactérias. Uma vez que a formação da parede celular é um processo tridimensional dinâmico, com formação e autólise ocorrendo ao mesmo tempo, quando as PBPs são inibidas, a autólise continua. Eventualmente, o peptidoglicano enfraquece e a célula explode devido à pressão osmótica interna (PAPP-WALLACE et al., 2011). Mesmo com essa

importante ação, os carbapenêmicos não ficaram ilesos ao longo do tempo. As bactérias Gram-negativas passaram a produzir carbapenemases, que são β -lactamases que degradam antibióticos β -lactâmicos, inclusive os carbapenêmicos. As carbapenemases são divididas em dois grandes grupos, baseados nas sequências dos aminoácidos: metalo- β -lactamases (Classe B) que possuem zinco no sítio ativo, e as serina- β -lactamases (Classes A, C e D), que contém serina. Pode-se incluir na classe A as enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), SME (*Serratia marcescens* carbapenemase), IMI (Imipenem carbapenemase), NMC (não-metallo carbapenemase) e GES (Guiana *extended-spectrum* β -lactamase) (QUEENAN, BUSH, 2007; PAPP-WALLACE et al., 2011).

Na família Enterobacteriaceae, a resistência aos carbapenêmicos tem surgido mais lentamente do que em outros bacilos Gram-negativos, entretanto essa prevalência está começando a mudar uma vez que esses micro-organismos têm desenvolvido múltiplos e sofisticados mecanismos de resistência aos antimicrobianos (NORDMANN, POIREL, 2014; SAMPAIO, GALES, 2016). Nesses micro-organismos, KPC pode ser considerada uma das principais carbapenemases, pertencente à classe A de Ambler e ao grupo funcional 2f de Jacoby e Medeiros (QUEENAN; BUSH, 2007) que confere resistência a todos antibióticos ativos contra *K. pneumoniae*, caracterizando a pan-resistência (SRINIVASAN; PATEL, 2008). Os genes que codificam as carbapenemases estão localizados em elementos genéticos móveis (plasmídeos), aumentando significativamente o risco de disseminação da enzima (GÜLMEZ et al., 2008; GOOTZ et al., 2009).

O primeiro isolado produtor de KPC foi encontrado em uma amostra clínica de *K. pneumoniae* na Carolina do Norte (EUA) em 1996 (YIGIT et al., 2001) e atualmente esta enzima encontra-se disseminada pelo mundo todo (BEIRÃO et al., 2011; CASTANHEIRA et al., 2013; RUIZ-GARBAJOSA et al., 2013). As bactérias produtoras de KPC são consideradas endêmicas nos Estados Unidos, Argentina, Brasil, Colômbia, China, Itália, entre outros (MUNOZ-PRICE et al., 2013; NORDMANN, POIREL, 2014). No Brasil, a produção de KPC foi recentemente relatada nas cidades do Rio de Janeiro, Recife e São Paulo, o que confirma a disseminação da enzima pelas Américas (MONTEIRO et al., 2009; PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009; PEIRANO et al., 2009). Desde o seu primeiro registro, já foram identificadas 24 variantes da família KPC (LAHEY CLINIC, 2017).

A dificuldade no tratamento de infecções graves por bacilos Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos levou ao retorno da utilização das polimixinas (polimixina B e colistina) em nível mundial como última opção no tratamento dessas infecções (STEIN;

RAOULT, 2002; FALAGAS; MICHALOPOULOS, 2006; BISWAS et al., 2012). Devido ao aumento do uso desses antibióticos já tem sido relatada resistência as polimixinas por bactérias que são normalmente susceptíveis a essas drogas (JOHANSEN et al., 2008; ARDUINO et al., 2012; MAMMINA et al., 2012), bem como relatos do aumento nas infecções causadas por bactérias naturalmente resistentes a polimixinas como as dos gêneros *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* e *Serratia* (HAYAKAWA et al., 2012; MERKIER et al., 2013; SAMONIS et al., 2014). Essas bactérias apresentam diversas maneiras de se protegerem de estímulos ambientais adversos incluindo a exposição a peptídeos antimicrobianos catiônicos como polimixina B e a colistina, incluindo alterações nos lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) que geralmente apresentam cargas negativas e são considerados os alvos iniciais das polimixinas (MOFFATT et al., 2010).

A epidemiologia hospitalar das infecções causadas por micro-organismos resistentes aos carbapenêmicos é complexa, em função da presença de vários genes de resistência e amostras clonais múltiplas que causam surtos e podem coexistir com amostras esporádicas que também podem ter um reservatório na comunidade. Recentemente, foi descrito por nossa equipe um dos maiores surtos de *K. pneumoniae* produtoras de KPC resistentes à polimixina no país (GONÇALVES et al., 2016), em que a transmissão cruzada entre os pacientes ficou clara pelas relações temporal e espacial observadas, já que vários pacientes ocuparam o mesmo leito, evidenciando problemas na adesão da higiene das mãos por parte dos profissionais de saúde, a inadequação da desinfecção do ambiente, além da sua associação com o consumo muito alto de antibióticos. A complexidade da disseminação e persistência de micro-organismos multirresistentes no ambiente hospitalar envolve a aquisição de elementos genéticos móveis de resistência, que pode fornecer ao micro-organismo uma vantagem seletiva sobre outros patógenos hospitalares (BAQUERO et al., 2011; JACKSON et al., 2011).

Epidemiologicamente, diferentes clones de KPC circulam nos hospitais brasileiros e diferem na sua virulência, perfil de resistência antimicrobiana e distribuição geográfica (ANDRADE et al., 2011; SEKI et al., 2011; ANDRADE et al., 2014). KPC possui distribuição ampla e heterogênea, encontrada em mais de 115 diferentes *Sequence Types* (STs) (CHEN et al., 2014). Amostras de *K. pneumoniae* multirresistentes pertencentes ao complexo clonal (CC) 258, que compreendem os STs 258, 11, 340 e outras variantes, merecem especial atenção devido a sua associação com a emergência e disseminação de KPC em diversos países (ANDRADE et al., 2011; CHEN et al., 2014; MARKOVSKA et al., 2015). O ST258 é

frequentemente encontrado na América Latina, América do Norte e Europa, enquanto que o ST11 prevalece na América Latina e Ásia. Outras variantes importantes incluem ST512, ST340 e ST437 (CHEN et al., 2014). No Brasil, o ST437 e ST11, variantes de loco único (SLV) do ST258, são frequentemente encontrados (SEKI et al., 2011; ANDRADE et al., 2011; NICOLETTI et al., 2012). Atualmente, estudos sugerem que a expansão clonal concomitante de STs e transmissão de determinantes genéticos de resistência estão produzindo uma mudança completa da epidemiologia de *K. pneumoniae* produtora de KPC, portanto é fundamental o monitoramento contínuo dessas amostras produtoras de KPC no mundo (BONURA et al., 2015).

Nos últimos anos, a literatura tem destacado a disseminação global de diferentes variantes de *K. pneumoniae*, epidêmicas e endêmicas, frequentemente associada com virulência e produção de biofilme, que podem conferir maior vantagem adaptativa e a emergência de novos genótipos de resistência aos antimicrobianos. Assim, os métodos de tipagem molecular, como “*Pulsed Field Gel Electrophoresis*” (PFGE) e “*Multilocus sequence typing*” (MLST) são fundamentais para determinar se os micro-organismos epidemiologicamente importantes são também geneticamente relacionados, auxiliando na detecção de surtos, na identificação das vias de transmissão e fontes de infecção. A técnica de PFGE é amplamente utilizada para classificação das amostras em linhagens clonais no decorrer de investigações de epidemiologia molecular, considerando o seu alto poder discriminatório, tipabilidade e reprodutibilidade (GALETTI, 2010). Por outro lado, a técnica de MLST envolve o sequenciamento de genes específicos e a designação de perfis de alelos, resultando em STs que são utilizadas com sucesso para a determinação de complexos clonais entre os patógenos de interesse hospitalar (CURRAN et al., 2004). Adicionalmente, o sequenciamento completo do genoma bacteriano tornou-se uma ferramenta importante na tipagem bacteriana, permitindo o estudo de epidemias mundiais, surtos regionais, determinação de redes de transmissão, e melhor compreensão da disseminação filogenética de agentes infecciosos como *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (SNITKIN et al., 2012; MATHERS et al., 2015).

A virulência de *K. pneumoniae* é o resultado da multiplicidade de fatores que agem simultaneamente para evadir das defesas do hospedeiro. Além dos vários fatores determinantes da resistência antimicrobiana, estes micro-organismos podem produzir diferentes tipos de fatores de virulência, tais como polissacarídeos capsulares (codificados por exemplo pelos genes *wabG* e *rmpA*) e adesinas, como fimbrias do tipo 1 e 3, cujas principais

subunidades fimbriais são codificadas pelos genes *fimH/fimA* e *mrkD*, respectivamente (NUNES, 2009; STAHLHUT et al., 2009; ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013). As fimbrias do tipo 3 promovem ligação às células endoteliais e dos epitélios respiratório e renal, através da adesina MrkD, com papel importante na formação de biofilmes (JAGNOW; CLEGG, 2003).

Também são estudados outros fatores de virulência, como o *pilus* comum de *E. coli* (ECP), codificado pelo gene *ecpA*, a hemolisina, codificada pelo gene *khe* e o sistema de aquisição de ferro, que incluem a aerobactina, importante proteína siderófora codificada pelo gene *iucC* (NUNES, 2009; USEIN et al., 2001; ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013). Foi demonstrado que as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL apresentam maior expressão de fatores de virulência que causam o desenvolvimento de infecções mais graves (GUPTA et al., 2003). O aumento da incidência de amostras de *K. pneumoniae* resistentes a múltiplos antimicrobianos, particularmente em amostras produtoras de KPC, incluindo amostras do Brasil, fazem com que a determinação dos mecanismos de virulência desses patógenos seja importante.

Além desses fatores de virulência, muito pouco é conhecido sobre outros fatores que podem participar da patogênese de infecções graves por *K. pneumoniae*. No entanto a formação de biofilme tem sido motivo de interesse pelos pesquisadores que estudam a epidemiologia desses micro-organismos. Biofilmes são comunidades bacterianas nas quais as células se aderem umas às outras e a uma superfície viva ou inerte. Estas células aderentes são envolvidas em uma matriz de polímero extracelular composta principalmente por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (LAPPIN-SCOTT, BASS, 2001; FLEMMING; WINGENDER, 2010).

A formação do biofilme tem como primeira etapa interações físico-químicas que permitem a adesão das células diretamente à superfície. Essas interações são classificadas como de longo alcance e curto alcance. As forças de interação inespecíficas de longo alcance que atuam sobre a adesão bacteriana inicial incluem as forças de Lifshitz-van der Waals, forças eletrostáticas de dupla camada elétrica, interações ácido-base e movimentos brownianos. Interações específicas de curto alcance operam em regiões altamente localizadas das superfícies de interação e incluem pontes de hidrogênio, interações iônicas e dipolos. Bactérias são transportadas à superfície por interações de longo alcance e quando em contato com ela (distâncias > 1,5 nm), as interações de curto alcance se tornam mais importantes (BUSSCHER; WEERKAMP, 1987; KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004; ARMENTANO

et al. 2014). A hidrofobicidade da superfície de adesão e da célula bacteriana desempenha papel importante na remoção do filme de água entre as superfícies de contato permitindo que as interações de curto alcance ocorram (SOUSA, 2009). De fato, a hidrofobicidade é uma das propriedades mais importantes envolvidas no fenômeno de adesão e pode ser definida como atração entre moléculas apolares ou fracamente polares quando imersas em um meio aquoso (BUSSCHER; WEERKAMP, 1987; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013; ABDALLAH et al., 2014). Células bacterianas desenvolveram diversas maneiras para usar o efeito hidrofóbico com o objetivo de aderir a um substrato.

Embora essas interações não específicas iniciais sejam importantes, a adesão estável à superfície depende de interações específicas entre as adesinas da parede celular dos micro-organismos e macromoléculas do próprio ambiente. Esta adesão é quase sempre mediada por polímeros extracelulares. Apêndices celulares externos, como flagelos, fimbrias e pili, também desempenham papel significativo na adesão celular inicial, além de formarem pontes entre as células e a superfície (LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013; FOSTER et al., 2014). O contato com a superfície e a instalação microbiana, é seguido pela fase de crescimento e divisão celular. Material extracelular é agregado fortalecendo as ligações entre as células e a superfície. Dentro de dias a meses, a adesão de outros micro-organismos é facilitada, bem como a liberação de novos colonizadores capazes de formar novos biofilmes, que se desprendem do biofilme maduro iniciando novo ciclo (OTTO, 2008; 2009; 2013b).

O tratamento de infecções associadas aos biofilmes é especialmente problemático, uma vez que utilizando uma variedade de mecanismos, bactérias em biofilmes podem ser de 10 a 1000 vezes mais resistentes a um antibiótico quando comparadas às mesmas células planctônicas (MAH; O'TOOLE, 2001; GIRARD et al., 2010; HENGZHUANG et al., 2011). Além dessa dificuldade, a frequência crescente de resistência aos antibióticos entre as bactérias formadoras do biofilme torna o tratamento ainda mais difícil (KWON et al., 2008).

O primeiro isolado de *K. pneumoniae* formador de biofilme foi descrito no final da década de 1988 (LECHEVALLIER, CAWTHON, LEE, 1988). Essas bactérias podem produzir uma camada espessa de biofilme extracelular, como um fator de virulência que auxilia o micro-organismo a se fixar em superfícies bióticas ou abióticas, evitando os efeitos dos agentes antimicrobianos (VUOTTO et al., 2014). Dessa forma, o conhecimento detalhado sobre a formação de biofilme e bactérias produtoras de biofilme é necessário para o tratamento de infecções relacionadas. Além disso, a determinação da diversidade genética pode ser útil

para prevenir a disseminação de micro-organismos causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde, para implementação de procedimentos preventivos e medidas de controle.

A resistência antimicrobiana é uma característica inata de biofilmes bacterianos que além do aumento das taxas de resistência relatada entre as amostras clínicas, pode complicar ainda mais o tratamento do paciente (RAJAMOHAN; SRINIVASAN; GEBREYES, 2009). De acordo com o trabalho de Sanchez et al. (2013), comparando a resistência a antibióticos e a capacidade de formação de biofilmes em amostras individuais, aquelas capazes de formar o biofilme foram mais frequentemente multirresistentes.

A associação de vantagens adaptativas como a resistência a agentes antimicrobianos e virulência é um quadro complexo para o tratamento de infecções bacterianas graves. Atualmente, clones ou complexos clonais de alto risco são responsáveis pela disseminação mundial de determinantes de resistência a antibióticos e/ou virulência, contribuindo para um aumento de morbidade e mortalidade em todo mundo (KWA et al., 2007; BEN-DAVID et al., 2011). Além disso, a demora para detectar e diagnosticar um micro-organismo e/ou suas vantagens adaptativas podem também contribuir para o atraso na intervenção médica precisa. Pouco se sabe sobre o impacto dessa associação, resistência e virulência, com outros mecanismos de resistência que poderiam exercer importante papel na capacidade de sobrevivência e reprodução bacteriana (*fitness* bacteriano).

Fitness é a capacidade de um indivíduo sobreviver e reproduzir em um dado ecossistema, frequentemente medido pela taxa de crescimento específica isolada e em comparação a outros potenciais competidores (p.ex. amostras bacterianas sensíveis vs. resistentes). É considerado um dos principais fatores que influenciam a taxa de desenvolvimento de resistência, a estabilidade da resistência, e a taxa em que a resistência pode diminuir, se o uso de antibiótico for reduzido (O'NEILL et al., 2006; MARTÍNEZ; BAQUERO; ANDERSSON, 2007; FOUCAULT; COURVALIN; GRILLOT-COURVALIN, 2009). A literatura sugere que as taxas de resistência, por exemplo às polimixinas, ainda são baixas devido ao custo energético sofrido pela amostra bacteriana para o fenótipo de desenvolvimento de resistência, reduzindo seu *fitness*. Entretanto, alguns autores afirmam que essas taxas podem aumentar a partir do momento que o uso dos antimicrobianos passar a se tornar mais comum, conseqüentemente levando ao desenvolvimento de resistência por adaptação, devido a pressão seletiva exercida pela droga (ROLAIN et al., 2011).

O custo do *fitness* associado à resistência aos antimicrobianos é frequentemente determinado por experimentos de competição entre amostras sensíveis ou resistentes a

determinados antibióticos em meios de cultura ou animais de laboratório. Geralmente, essas técnicas envolvem gastos enormes, considerando que muitas delas envolvem experimentos de mutações utilizando amostras isogênicas (ABDELRAOUF et al., 2011; GUO et al., 2012). Técnicas trabalhosas, porém menos dispendiosas envolvem a mistura de amostras individuais em proporções 1:1, que são repetidamente transferidas para meios de crescimento/animais após cada ciclo de crescimento competitivo. Em cada ciclo, o número de células totais e resistentes é determinado pelo plaqueamento de alíquotas em placas contendo meio de cultura não seletivo, suplementado ou não com antibióticos. A aptidão relativa é expressa como índice de competição, calculado como a relação à contagem da carga bacteriana entre as amostras resistentes e susceptíveis no final de um experimento, dividido pela mesma razão (GUO et al., 2012). Essa abordagem é comumente utilizada em muitos estudos, inclusive no nosso, embora seja demorada e laboriosa. Para determinar a diferença na aptidão entre duas amostras, são conduzidos numerosos ciclos de competição. A duração do experimento pode ser ainda mais longa se houver apenas uma pequena diferença na aptidão entre as duas amostras avaliadas.

Avaliar a participação de fenótipos como ESBL e KPC entre *K. pneumoniae* multirresistentes é de grande importância, uma vez que sua frequência vem aumentando significativamente no mundo todo, além de apresentar altos índices de resistência aos β -lactâmicos (antibióticos mais prescritos na prática clínica), detectados previamente por nossa equipe (MOREIRA et al., 2013; DANTAS et al., 2014), sendo considerados hoje um dos maiores problemas terapêuticos em muitas instituições. Atualmente as amostras de *K. pneumoniae* de nossa instituição se apresentam com índices de resistência aos β -lactâmicos e carbapenêmicos bastante relevantes, porém a análise da disseminação e STs, bem como produção de biofilme e *fitness* bacteriano, ainda não havia sido estudada no Hospital de Clínicas da UFU, e o presente estudo pretende responder algumas questões ainda não completamente esclarecidas sobre a epidemiologia desses agentes.

2. OBJETIVOS

Considerando a necessidade de realizar estudos que permitam compreender melhor a resistência, virulência, formação de biofilme, bem como a capacidade de adaptação de amostras clínicas de *Klebsiella pneumoniae*, são propostos os seguintes objetivos:

- Determinar a presença dos genes de resistência *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}/*bla*_{KPC-2} e de virulência *fimH*, *fimA*, *wabG*, *iucC*, *rmpA*, *ecpA*, *mrkD* e *khe* em amostras de *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de terceira geração e/ou carbapenêmicos provenientes de infecção e/ou colonização;
- Determinar a relação clonal entre as linhagens por meio de PFGE;
- Determinar, por MLST, os STs e os complexos clonais dos pulstipos obtidos através do PFGE;
- Analisar a formação de biofilme entre as amostras de *K. pneumoniae* com maior proporção de genes de virulência através de técnicas fenotípicas bem como por microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar a relação entre multirresistência e produção de biofilme;
- Avaliar o impacto da resistência aos carbapenêmicos e polimixina B no *fitness* bacteriano em amostras de *K. pneumoniae*;
- Avaliar o consumo de antibióticos no hospital através da dose diária definida por 1000 pacientes-dia de antimicrobianos, pertencentes às classes de cefalosporinas de 3^a e 4^a geração, carbapenêmicos, fluorquinolonas e polimixina B e sua relação com as taxas dos fenótipos ESBL e KPC.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras bacterianas e desenho do estudo

As amostras de *Klebsiella pneumoniae* foram selecionadas randomicamente a partir de uma coleção recuperada de pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) no período de junho de 2009 a julho de 2015, incluídas no estudo aquelas resistentes às cefalosporinas de amplo espectro e/ou carbapenêmicos. No total foram selecionadas 60 amostras não-duplicadas de *K. pneumoniae*, sendo 30 recuperadas de infecção por *K. pneumoniae* sensível aos carbapenêmicos (KpSC), 20 infecções e 10 colonizações por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (KpRC). Foram recuperados dados epidemiológicos dos prontuários médicos dos pacientes incluídos no estudo. As cepas-controle estão descritas no quadro 1.

Quadro 1. Cepas-controle que foram utilizadas nos experimentos.

Cepas-controle	Característica	Experimento
<i>K. pneumoniae</i> MGH-78578	<i>fimA</i> , <i>mrkD</i>	PCR
<i>K. pneumoniae</i> Kp 740/11	<i>fimH</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{KPC}</i>	PCR
<i>E. coli</i> ATCC 55989	<i>iucC</i>	PCR
<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>ecpA</i>	PCR
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044	<i>khe</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i> , <i>wabG</i> , <i>rmpA</i>	PCR, Biofilme
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	Amostra multissensível	<i>Fitness</i> bacteriano

3.2. Identificação das espécies

A identificação e os testes de resistência aos antimicrobianos foram realizados pelo Laboratório de Microbiologia do HC-UFU, utilizando o sistema automatizado VITEK 2® (bioMérieux), exceto para as amostras de colonização. As amostras bacterianas utilizadas no estudo foram identificadas pelo Laboratório de Microbiologia do HC-UFU através do sistema automatizado VITEK®2 (bioMérieux). As culturas testes foram suspensas em solução salina 0,45% com objetivo de obter uma suspensão com turbidez compatível com a escala de 0,50 a 0,63 de McFarland utilizando turbidímetro. Em seguida, os cartões foram inseridos no aparelho e cada teste bioquímico foi preenchido, selado e incubado. Durante o período de

incubação (7-10 horas) os cartões foram lidos a cada 15 minutos através de um sistema óptico de transmitância usando diferentes comprimentos de onda no espectro visível. Os resultados foram analisados através de algoritmos pelo software do aparelho e reportados automaticamente.

As amostras bacterianas identificadas foram preservadas a -80°C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) acrescido de 15% de glicerol.

3.3. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de diluição em gel, através do sistema automatizado VITEK®2 (bioMérieux), no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU. As culturas teste foram suspensas em solução salina 0,45% com objetivo de obter uma solução com turbidez de 0,50 a 0,63 de McFarland e em seguida, diluídas conforme as recomendações do fabricante. Os cartões foram inseridos no aparelho e automaticamente preenchidos com as suspensões bacterianas. No cartão, os antimicrobianos são encontrados em duas a quatro concentrações diferentes. Cada poço com o antibiótico teste foi avaliado automaticamente a cada 15 minutos durante 18 horas de maneira a gerar uma curva de crescimento e, por comparação com um controle, a concentração inibitória mínima (CIM) de cada antibiótico foi estimada. Esse cálculo foi realizado com um algoritmo específico para cada antimicrobiano.

A resistência aos seguintes antimicrobianos foi avaliada: amoxicilina + clavulanato, amicacina, ampicilina, cefepime, cefoxitina, ceftriaxona, ciprofloxacina, gentamicina, levofloxacina, piperacilina + tazobactam, tigeciclina, ertapenem, imipenem, meropenem e colistina.

3.4. Disco difusão

Para as amostras de *K. pneumoniae* recuperadas de colonização, o sistema automatizado VITEK®2 apresentou resultados para os antimicrobianos colistina e carbapenêmicos, enquanto os demais foram realizados pelo teste de disco difusão de acordo com o CLSI (2014).

Os discos testados e suas respectivas concentrações foram: amoxicilina + clavulanato (10 µg), amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), cefepime (30 µg), ceftaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), gentamicina (10 µg), piperacilina + tazobactam (10 µg), ertapenem (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg).

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

3.5. Definições

Micro-organismo multirresistente: resistência a pelo menos um agente antimicrobiano dentro de 3 ou mais classes: aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina), carbapenêmicos (imipenem e meropenem), cefalosporinas (ceftazidima e cefepime), fluorquinolonas (ciprofloxacino e levofloxacino), penicilinas/inibidores de β -lactamases (piperacilina associada ao inibidor tazobactam), monobactâmicos (aztreonam) e polimixinas (colistina e polimixina B) (MAGIORAKOS et al., 2012).

Terapia antimicrobiana inapropriada: micro-organismo amostra com resistência *in vitro* ao antimicrobiano usado no tratamento do paciente e/ou ausência de terapia durante 24 horas ou mais após o diagnóstico microbiológico da infecção (GILBERT et al., 2007).

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

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

Mortalidade total: relação entre o número de óbitos durante a internação hospitalar dos pacientes colonizados e o número total de pacientes.

Dose Diária Definida de antimicrobiano por 1000 pacientes-dia (DDD/1000 pacientes-dia)

Foi calculado o consumo em DDD por 1000 pacientes-dia naquelas clínicas nas quais pertencem os pacientes incluídos neste trabalho. Os valores do DDD foram disponibilizados pela farmácia do HC-UFU, e as taxas de infecções por *K. pneumoniae* produtoras de KPC e ESBL de 2009 a 2016, disponibilizadas pelo Laboratório de Microbiologia do HC-UFU. Foram selecionados para cálculos das densidades de uso por 1000 pacientes-dia os seguintes antibióticos: imipenem, meropenem, cefepime, ceftriaxona, ciprofloxacino, levofloxacino e polimixina B, como proposto pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000). A densidade de uso (DDD por 1000 pacientes-dia) foi obtida pela fórmula:

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

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

^A Pacientes-dia: P x L x T

P = Período de tempo em observação, em dias.

L = Leitos disponíveis na unidade.

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

3.6. Comitê de Ética

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

3.7. Técnicas Moleculares

3.7.1. Extração do DNA genômico

A extração por lise térmica foi realizada segundo Nunes et al., 2009. As amostras foram cultivadas em ágar *Trypticase soy agar* (TSA) por 18-24 horas, colônias puras foram ressuspensas em 1 mL de tampão Tris-Edta (TE; Tris [1M] + EDTA [0,5 M]) [1x] e centrifugadas a 12000 xg por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado em 1 mL de tampão TE. Os tubos foram fervidos (100°C) por 10 minutos em termobloco, centrifugados a 12000 xg por 2 minutos e o sobrenadante contendo o DNA foi recuperado. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria (Nanodrop®) e armazenado a -20°C no freezer até o momento da utilização.

3.7.2. Detecção dos genes de resistência por PCR

Para avaliar a presença dos genes *bla_{CTX-M}* e *bla_{KPC}* foram realizadas as técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional com *primers* consensos para cada gene. Foram utilizados reagentes para um volume final de reação de 25 µL, conforme descrito no quadro 2. Os *primers* utilizados nas reações estão descritos no quadro 3. Adicionalmente, os genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* foram avaliados nas amostras KpSC seguindo o protocolo de Monstein et al. (2007).

Quadro 2. Reagentes para realização da Reação em Cadeia da Polimerase.

Reagentes	Volume	Concentração final
Produto da extração de DNA (10 ng/µL)	2 µL	0,4 ng/µl
<i>primer forward</i> (10 uM)	0,75 µL	0,3 µM
<i>primer reverse</i> (10 uM)	0,75 µL	0,3 µM
GoTaq® Green Master Mix, 2x	12,5 µL	1x
Água ultrapura autoclavada	q.s.p. 25 µL	n.a.

Quadro 3: *Primers* para amplificação dos genes de resistência das amostras de *K. pneumoniae* por Reação em Cadeia da Polimerase.

Gene alvo ¹	Primer	Sequências (5' - 3')	Temp. de anelamento (°C)	Amplicon (pb)
<i>bla_{KPC}</i>	F	GTATCGCCGTCTAGTTCTGCTG	54	860
	R	GTTGACGCCCAATCCCTCGA		
<i>bla_{CTX-M}</i>	F	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	58	593
	R	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG		

F = *Forward*; R = *Reverse*

Referências: 1. *bla_{KPC}*: Galetti, 2010; *bla_{CTX-M}*: Monstein et al., 2007

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

A eletroforese correu a 90V por cerca de 60 minutos em gel de agarose 1,5%, no tampão de corrida TBE (Tris, Ácido bórico e EDTA) [0,5x]. O gel foi corado com 5 µL de SYBER® Safe (Applied Biosystems®) para cada 100 mL de tampão e fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia®).

3.7.3. Detecção dos genes de virulência *ecpA*, *fimA*, *wabG*, *rmpA*, *fimH*, *iucC*, *khe* e *mrkD*

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

Quadro 4: *Primers* para amplificação dos genes de virulência das amostras de *K. pneumoniae* por Reação em Cadeia da Polimerase.

Gene alvo ¹	Primer	Sequências (5' - 3')	Temp. de anelamento (°C)	Amplicon (pb)
<i>ecpA</i>	F	GCAACAGCCAAAAAAGACACC	52	477
	R	CCAGGTCGCGTCGAACTG		
<i>fimA</i>	F	CGGACGGTACGCTGTATTTT	50	500
	R	GCTTCGGCGTTGTCTTTATC		
<i>wabG</i>	F	CGGACTGGCAGATCCATATC	50	683
	R	ACCATCGGCCATTTGATAGA		
<i>rmpA</i>	F	GCAGTAACTGGACTACCTCTG	50	322
	R	GTTTACAATTCGGCTAACATTTTTCTTTAAG		
<i>fimH</i>	F	CACGCAAGGCACCATTC	55	900
	R	GCTCAGAATCAACATCGGTAAC		
<i>iucC</i>	F	AAACCTGGCTTACGCAACTGT	56	400
	R	ACCCGTCTGCAAATCATGGAT		
<i>khe</i>	F	ACCGTCCTGCCCCGATTTAAT	56	600
	R	GATAAACCACAGGCGCATAGTG		
<i>mrkD</i>	F	TTGTTGCTGCTGGTTTGGTTC	53	600
	R	CGAGTTTCCTGGCTTTGTAATG		

ecpA e *fimA*: Alcántar-Curiel et al. 2013; *wabG*: Chen et al., 2014; *rmpA*: Fang et al. 2007; *fimH*: Stahlhut et al. 2009; *iucC*: Usein et al. 2001, *khe* e *mrkD*: Nunes, 2009.

1. Referências:

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

Trinta e seis amostras de *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de 3^a geração e positivas para os genes de β -lactamase por PCR foram analisadas por PFGE conforme metodologia padronizada no Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia (MICROMOL-UFU).

Uma colônia de cada bactéria foi inoculada em 3 mL de caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*) e incubada a 37°C durante 24 horas, sob agitação de 200 rpm. A concentração celular foi ajustada com o caldo TSB para os valores entre 0,9 a 1,10, na OD₆₄₀ nm. 200 μ L da suspensão celular ajustada foi transferida para um microtubo estéril, centrifugada a 12.000 xg por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante foi completamente descartado.

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

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

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

3.7.5. Caracterização das amostras bacterianas utilizando sequências de fragmentos internos: MLST (*Multilocus Sequence Typing*)

Para amostras de *K. pneumoniae* previamente avaliados por PFGE, foi realizada tipagem por sequenciamento de multilocus, segundo esquema proposto por Diancourt e

colaboradores (2005). O método é baseado na amplificação e sequenciamento de fragmentos internos de 7 genes *housekeeping* de *K. pneumoniae*: *rpoB* (β -subunit of RNA polymerase); *gapA* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase); *mdh* (malate dehydrogenase); *pgi* (phosphoglucose isomerase); *phoE* (phosphorine E); *infB* (translation initiation factor 2) e *tonB* (periplasmic energy transducer).

A metodologia foi realizada seguindo orientações do website <http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/primers_used.html>, utilizando os *primers* e condições descritas no quadro 5. Os alelos e STs obtidos em cada amostra avaliada foram comparados com os alelos e STs de todas as linhagens disponibilizadas no banco de dados MLST para *K. pneumoniae*.

Quadro 5: *Primers* utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes *housekeeping* para análise por *Multilocus Sequence Typing*.

Gene alvo ¹	Primer	Sequências (5' - 3')	Temp. de anelamento (°C)	Amplicon (pb)
<i>rpoB</i>	F: Vic3	GGCGAAATGGCWWGAGAACCA	58	1075
	R: Vic2	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC		
<i>gapA</i>	F:gapA173	TGAAATATGACTCCACTCACGG	60	662
	R:gapA181	CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT		
<i>mdh</i>	F:mdh130	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG	60	756
	R:mdh867	CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG		
<i>pgi</i>	F:pgi1F	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	60	566
	R:pgi1R	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT		
<i>phoE</i>	F:phoE604.1	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	59	602
	R:phoE604.2	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT		
<i>infB</i>	F:infB1F	CTCGCTGCTGGACTATATTCG	58	462
	R:infB1R	CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC		
<i>tonB</i>	F:tonB1F	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	60	539
	R:tonB2R	ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG		

1. Referências dos primers MLST: Instituto Pasteur. Disponível em:

<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/primers_used.html>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2017.

3.7.6. Purificação e sequenciamento dos genes *bla_{KPC}* e *housekeeping*

Após a confirmação da presença do gene *bla_{KPC}* nas primeiras 6 amostras avaliadas e amplificação dos genes *housekeeping*, foi realizada uma segunda eletroforese em gel de

agarose. Após visualização das bandas correspondentes, estas foram recortadas do gel com auxílio de um bisturi, e submetidas ao procedimento de purificação utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

O sequenciamento genético foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA, utilizando de 30 a 60 ng do DNA obtido após purificação. Os resultados foram comparados com os dados disponíveis no GenBank, banco de dados de sequências mantido pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) através do editor de alinhamento de sequências biológicas *Geneious* versão 10.0.9 (Biomatters). Para o MLST, a construção dos grupos de similaridade entre os STs foi realizada pelo goeBURST (disponível em: <http://goeburst.phyloviz.net/>).

3.8. Avaliação da produção de biofilme

Para os ensaios de produção de biofilme as amostras foram selecionadas de acordo com a frequência de genes de virulência detectados previamente pelo PCR, bem como diferentes perfis no PFGE e MLST. Como controle positivo foi utilizado a amostra *K. pneumoniae* NTUH-K2044 e como controle negativo apenas o meio de cultura sem inóculo bacteriano. A pesquisa de biofilme foi realizada de acordo com Merritt; Kadouri e O'Toole (2005), com algumas modificações conforme descrito abaixo. Todos os experimentos foram repetidos em três experimentos independentes.

3.8.1. Preparação do inóculo bacteriano

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

3.8.2. Ensaio de adesão a superfície inerte

A suspensão celular obtida pelo crescimento *overnight* ($\sim 10^9$ células/mL) foi lavada duas vezes em solução salina estéril (20 mL NaCl 0,9%, 7800 rpm, 10 minutos) e diluída para uma concentração celular de aproximadamente 10^7 células/mL em TSB. 200 μ L dessa

suspensão de células foi inoculada em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços, 3 poços para cada amostra testado. As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C sob agitação a 120 rpm. Após o período de adesão, os poços foram raspados para remoção das células aderidas (*scrapping*). Diluições seriadas foram realizadas e as suspensões celulares plaqueadas em ágar TSA para enumeração das células.

3.8.3. Contagem de células viáveis no biofilme

Foram realizados dois ensaios diferentes para formação de biofilme, um para enumeração de células viáveis do biofilme e outro para quantificação de biomassa. A suspensão celular obtida pelo crescimento *overnight* ($\sim 10^9$ células/mL) foi diluída para uma concentração celular de aproximadamente 10^7 células/mL. Para cada amostra, 200 μ L dessa suspensão de células foi inoculada em 3 poços das microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços. Após 24 horas de incubação, os poços foram raspados para remoção das células aderidas (*scrapping*) por tempo determinado (1 minuto e 30 segundos). Diluições seriadas foram realizadas e as suspensões celulares plaqueadas em Agar TSA para enumeração das células.

3.8.4. Produção de biomassa

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

3.8.5. Classificação do biofilme

Após o experimento de quantificação da biomassa por cristal violeta, as amostras foram classificadas nas categorias de não produtor, produtor fraco, produtor moderado e produtor forte de biofilme, de acordo com os critérios descritos por Saxena e colaboradores (2014) (Quadro 6).

Quadro 6. Critérios para classificação da produção de biofilme.

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

Valor de *cut-off* da densidade ótica (DO): média da DO controle negativo + 3x desvio padrão; ¹DO_i do amostra; ²DO_c do controle negativo.

3.8.6. Formação de biofilme em esferas de vidro e análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras Kp30 (KpSC) e KPC05 (KpRC) foram selecionadas para a análise da arquitetura dos biofilmes bacterianos em esferas de vidro por MEV, após resultados individuais nos ensaios de adesão e formação de biofilme em placas de poliestireno.

Seguiu-se o mesmo procedimento do ensaio de formação de biofilme, porém o ensaio para MEV foi realizado em placas de 24 poços, utilizando 2 mL de meio de cultura (TSB) por poço e a inserção de duas esferas de vidro padronizadas de 0,5 cm de diâmetro para cada amostra, uma por poço. Após formação de biofilme, as esferas foram fixadas em glutaraldeído/paraformaldeído 2,5% a 4°C por 18 horas; lavadas em solução PBS (pH 7,4) por três vezes; armazenadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas a temperatura ambiente; lavadas novamente em solução PBS (pH 7,4) por três vezes; desidratadas em álcool 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% (3 vezes), por 20 minutos cada a temperatura ambiente e em seguida levadas ao procedimento de secagem (ponto crítico). As esferas foram metalizadas com ouro na espessura de 20 nm, visualizadas e fotografadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura (Zeiss) disponível no Laboratório da Engenharia Química – UFU.

3.9. Determinação do *fitness* bacteriano

Para analisar o impacto das resistências aos carbapenêmicos e à polimixina B no *fitness* de *K. pneumoniae* produtoras de KPC, foram utilizadas três amostras nesses experimentos: uma resistente aos carbapenêmicos (KPC05), uma resistente aos carbapenêmicos e à polimixina B (KPC13) e a amostra multissensível ATCC 10031.

3.9.1. Experimentos de competição de crescimento *in vitro*

Os experimentos de competição *in vitro* foram realizados da seguinte maneira: competição entre KPC05 e ATCC10031, KPC13 e ATCC10031 e entre KPC05 e KPC13, seguindo o protocolo de Abdelraouf et al. (2011) com algumas modificações.

Uma colônia isolada de cada bactéria teste foi inoculada em 20 mL de caldo TSB e incubada sob agitação contínua a 120 rpm, 37°C, por 18 horas. Após esse período, as suspensões bacterianas foram lavadas duas vezes em NaCl 0,9% (20°C, 5000 rpm, 10 minutos) e os *pellets* ressuspensos em igual volume de NaCl 0,9%. Uma diluição intermediária foi realizada pela transferência de 100 µL de cada suspensão bacteriana (~10⁹ células/mL) para tubos contendo 10 mL de NaCl 0,9% de forma a obter aproximadamente 10⁷ células/mL. 500 µL de cada suspensão bacteriana, obtida a partir dessa diluição, foram transferidos para um frasco contendo 50 mL de TSB para um inóculo inicial de aproximadamente 10⁵ células/mL de cada amostra (1:1).

A cultura heterogênea foi então incubada a 37°C por 24 horas sob agitação a 120 rpm, caracterizando um ciclo de competição. Durante o primeiro ciclo de competição, a carga bacteriana foi avaliada por cultura quantitativa de uma alíquota de 1 mL recuperada nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas. Após o primeiro ciclo, 50 µL da suspensão celular (em competição) foram transferidos para um novo frasco contendo 50 mL de TSB, que foi incubado a 37°C por 24 horas sob agitação a 120 rpm, caracterizando um novo ciclo. No total, 6 ciclos sucessivos de competição foram realizados a cada 24 horas (24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas). A partir do segundo ciclo, a cultura quantitativa foi realizada apenas 24 horas após a inoculação.

A carga bacteriana foi determinada nos intervalos de tempo descritos acima por cultura quantitativa da alíquota plaqueada em ágar TSA livre de antibiótico, para contagem de células totais, TSA suplementado com carbapenêmico (≥ 4 µg/mL meropenem; CLSI, 2014) para KPC05 e TSA suplementado com polimixina B (≥ 8 µg/mL, EUCAST, 2017) para KPC13.

As placas foram incubadas na estufa a 37°C por 24 horas. O número de células da amostra ATCC multissensível foi inferido a partir da diferença entre a contagem total de bactérias obtida no TSA sem antibiótico em relação ao TSA suplementado.

Os experimentos foram realizados em triplicata e a aptidão relativa foi expressa como índice de competição (IC) (BECEIRO et al., 2014), calculado como sendo a razão da carga bacteriana entre as amostras resistentes e suscetíveis no final de um experimento. Neste trabalho foram determinados os valores de IC na competição entre KPC05/ATCC10031, KPC13/ATCC10031 e KPC05/KPC13. Um valor de IC inferior a 1 indica um defeito no *fitness*; e um valor superior a 1 indica um benefício do *fitness*.

3.10. Análise Estatística

Os ensaios quantitativos foram comparados por meio de análise de variância simples (One way ANOVA) ou pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando como pós-testes os testes de comparação múltipla de Bonferroni ou Dunn's, quando apropriado. A curva de sobrevivência foi desenhada usando estimativa de Kaplan-Meier e comparada com o teste de Gehan-Breslow Wilcoxon. Para comparar as médias no experimento do *fitness* bacteriano, foram utilizados os testes *t de Student* ou *U de Mann Whitney*, quando apropriado. O teste de Pearson/Spearman foi realizado para correlacionar as variáveis DDD por 1000 pacientes-dia e taxas de ESBL e KPC. Todos os testes foram realizados com um nível de confiança de 95%, sendo os resultados obtidos através do software GraphPad Prism®, versão 5.01, considerando significativo $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Durante o período de junho de 2009 a julho de 2015, foram selecionadas aleatoriamente 60 amostras de *Klebsiella pneumoniae* recuperadas de 60 pacientes infectados, sendo 30 *K. pneumoniae* sensíveis aos carbapenêmicos, e 20 e 10 infecções e colonizações, respectivamente, de *K. pneumoniae* resistentes a estes β -lactâmicos. Os resultados obtidos estão na figura 1.

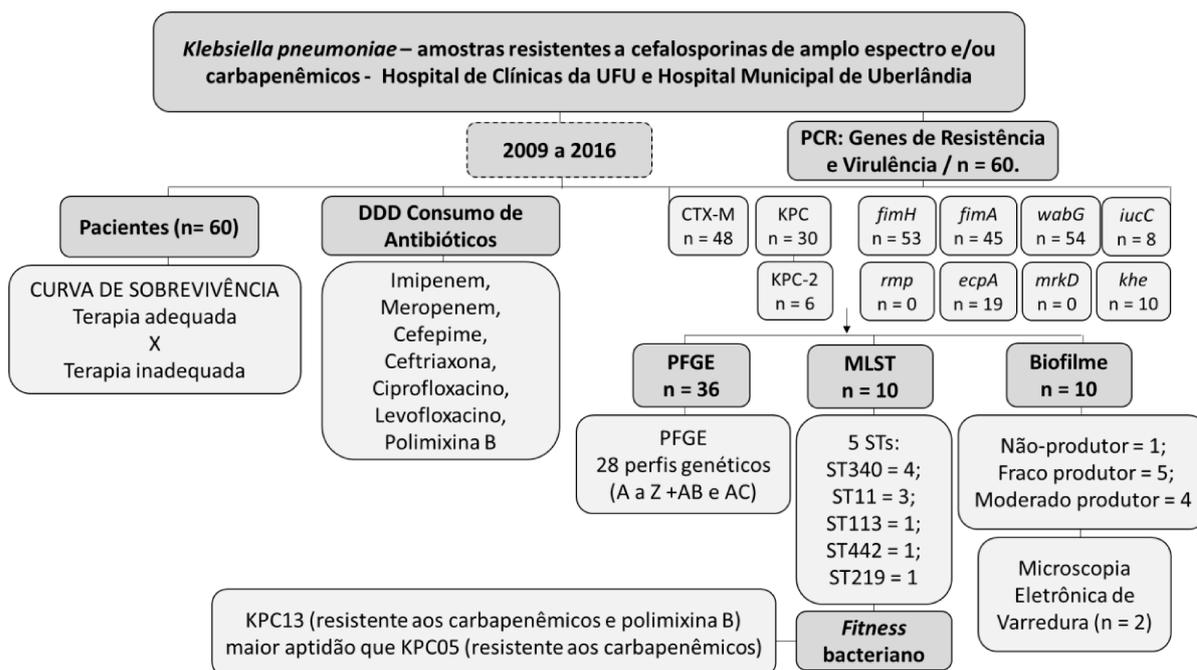


Figura 1. Organograma referente aos pacientes com infecções e colonizações por *Klebsiella pneumoniae* resistentes às cefalosporinas de amplo espectro e/ou carbapenêmicos.

As características demográficas, clínicas e epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo estão na tabela 1. A média de idade dos pacientes foi de 53 anos (variação entre 3 - 85 anos), sendo a maioria do sexo masculino (n = 37; 61,7%), 66,7% clínicos e 23,3% com trauma quando da internação na unidade, e aproximadamente 63% dos pacientes necessitavam de cirurgia. As principais comorbidades observadas incluíam nefropatia (n= 18; 30%), diabetes *mellitus* (n= 15; 25%) e cardiopatia (n= 14; 23%). Em relação aos procedimentos invasivos a maior frequência foi de cateter venoso central (n= 44; 73,3%), seguido de ventilação mecânica (n = 43; 71,7%) e sonda nasointestinal, nasogástrica ou orogástrica (n = 42; 70,0%). A média do tempo de internação entre os pacientes foi de 53 dias (variação entre 9 – 189 dias), sendo que a maioria fez uso prévio de glicopeptídeos (n= 41; 68,3%), carbapenêmicos (n= 35; 58,3%) e cefalosporinas de amplo espectro (n= 53; 88%).

Diferenças importantes foram encontradas entre os pacientes com infecção/colonização por amostras sensíveis e resistentes aos carbapenêmicos, destacando-se: elevado uso prévio de β -lactâmicos (53%), carbapenêmicos (73,3%) e polimixina B (43,3%). A terapia antibiótica inadequada foi prevalente em 56,7% dos casos, mas naqueles com infecções por KpRC sua frequência foi bem maior (70%). 45% dos pacientes evoluíram para o óbito, mas a frequência foi significativa naqueles com infecção por amostras resistentes, com frequências de mortalidades total de 63,3% e em 30 dias de 30,0%. No entanto, os resultados da curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* em relação a estas taxas (Fig. 2) não confirmou que o grupo de pacientes que receberam terapia antimicrobiana inapropriada teve menor probabilidade de sobrevivência.

Tabela 1. Características clínicas e demográficas de pacientes colonizados e infectados por *Klebsiella pneumoniae* sensível e resistente aos carbapenêmicos, recuperadas de pacientes hospitalizados

	Pacientes (n = 60)	KpSC¹ (n=30)	KpRC² (n=30)
Idade, anos, média \pm SD³	53,20 (\pm 15,54)	55,80 (\pm 16,73)	50,60 (\pm 13,67)
Tempo de Internação, dias, média \pm SD	56,42 (\pm 27,40)	64,3 (\pm 35,90)	48,50 (\pm 17,57)
Tempo de hospitalização anterior ao isolamento, média (amplitude; SD)	33,60 (2-181; 19,17)	36,83 (2-181; 25,28)	30,37 (4-63; 12,74)
Tempo em que o paciente evoluiu para alta ou óbito após cultura positiva, média (amplitude; SD)	21,82 (1-114; 14,81)	27,53 (2-114; 20,81)	16,10 (1-43; 7,60)
Sexo			
Masculino	37 (61,7)	17 (56,7)	20 (66,7)
Feminino	23 (38,3)	13 (43,3)	10 (33,3)
Diagnóstico de Internação			
Clínico	40 (66,7)	20 (66,7)	20 (66,7)
Cirúrgico	6 (10,0)	3 (10,0)	3 (10,0)
Trauma	14 (23,3)	7 (23,3)	7 (23,3)
Clínica de Isolamento			
Clínica Cirúrgica	11 (18,3)	9 (30,0)	2 (6,7)
Clínica Médica	7 (11,7)	7 (23,3)	0 (0,0)
Emergência	9 (15,0)	6 (20,0)	3 (10,0)
Moléstia Infecçiosa	1 (1,7)	1 (3,3)	0 (0,0)
Oncologia	2 (3,3)	0 (0,0)	2 (6,7)
Pediatria	2 (3,3)	2 (6,7)	0 (0,0)
Transplante	2 (3,3)	2 (6,7)	0 (0,0)
Unidade de Terapia Intensiva	24 (40,0)	3 (10,0)	21 (70,0)
Não especificado	2 (3,3)	0 (0,0)	2 (6,7)

(continua)

Tabela 1. Características clínicas e demográficas de pacientes colonizados e infectados por *Klebsiella pneumoniae* sensível e resistente aos carbapenêmicos, recuperadas de pacientes hospitalizados

	Pacientes (n = 60)	KpSC¹ (n=30)	KpRC² (n=30)
(continuação)			
Uso Prévio de Antimicrobianos, n (%)	60 (100,0)		
Beta-lactâmicos com inibidor ⁴	18 (30,0)	2 (6,7)	16 (53,3)
Cefalosporinas de 3 ^a geração ⁵	22 (36,7)	12 (40,0)	10 (33,3)
Cefalosporinas de 4 ^a geração ⁶	31 (51,7)	15 (50,0)	16 (53,3)
Carbapenêmicos ⁷	35 (58,3)	13 (43,3)	22 (73,3)
Aminoglicosídeos ⁸	8 (13,3)	2 (6,7)	6 (20,0)
Glicopeptídeos ⁹	41 (68,3)	17 (56,7)	24 (80,0)
Fluoroquinolonas ¹⁰	22 (36,7)	13 (43,3)	9 (30,0)
Polimixina B	16 (26,7)	3 (10,0)	13 (43,3)
Tratamento, n (%)¹¹			
Beta-lactâmicos com inibidor ⁴	8 (13,3)	2 (6,7)	6 (30,0)
Cefalosporinas de 3 ^a geração ⁵	7 (11,7)	3 (10,0)	4 (20,0)
Cefalosporinas de 4 ^a geração ⁶	12 (20,0)	6 (20,0)	6 (30,0)
Carbapenêmicos ⁷	28 (46,7)	15 (50,0)	13 (65,0)
Aminoglicosídeos ⁸	7 (11,7)	2 (6,7)	5 (25,0)
Glicopeptídeos ⁹	18 (30,0)	8 (26,7)	10 (50,0)
Fluoroquinolonas ¹⁰	8 (13,3)	4 (13,3)	4 (20,0)
Polimixina B	9 (15,0)	1 (3,3)	8 (40,0)
Terapia			
Inadequada	34 (56,7)	13 (43,3)	21 (70,0)
Admissão na UTI, n (%)¹²	44 (73,3)	20 (66,7)	24 (80,0)
Co-morbidades, n (%)			
Cardiopatía	14 (23,3)	6 (20,0)	8 (26,7)
Diabetes mellitus	15 (25,0)	12 (40,0)	3 (10,0)
Nefropatia	18 (30,0)	8 (26,7)	10 (33,3)
Câncer	13 (21,7)	7 (23,3)	6 (20,0)
Hipertensão Arterial Sistêmica	13 (21,7)	12 (40,0)	1 (3,3)
Outros ¹³	6 (10,0)	3 (10,0)	3 (10,0)
Procedimentos Invasivos	56 (93,3)	26 (86,7)	30 (100,0)
Cateter Venoso Central	44 (73,3)	20 (66,7)	24 (80,0)
Ventilação Mecânica	43 (71,7)	20 (66,7)	23 (76,7)
Sonda Vesical	36 (60,0)	18 (60,0)	18 (60,0)
Dreno	10 (16,7)	5 (16,7)	5 (16,7)
Sonda nasoenteral, nasogástrica ou orogástrica	42 (70,0)	16 (53,3)	26 (86,7)
Nutrição Parenteral	26 (43,3)	5 (16,7)	21 (70,0)
Cirurgia	38 (63,3)	15 (50,0)	23 (76,7)

Tabela 1. Características clínicas e demográficas de pacientes colonizados e infectados por *Klebsiella pneumoniae* sensível e resistente aos carbapenêmicos, recuperadas de pacientes hospitalizados

	Pacientes (n = 60)	KpSC ¹ (n=30)	KpRC ² (n=30)
Sítio de isolamento, n (%)	60 (100,0)		
Sangue	26 (43,3)	17 (56,7)	9 (30,0)
Urina	13 (21,7)	9 (30,0)	4 (13,3)
Pulmão	9 (15,0)	4 (13,3)	5 (16,7)
Líquor	2 (3,3)	0 (0,0)	2 (6,7)
Mucosa anal	10 (16,7)	0 (0,0)	10 (33,3)
Mortalidade total	27 (45,0)	8 (26,7)	19 (63,3)
Mortalidade em 30 dias	11 (40,7)	2 (6,7)	9 (30,0)

(conclusão)

1. KpSC: Amostras de *K. pneumoniae* sensíveis aos carbapenêmicos; KpRC: Amostras de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos; 3. SD, Standard Deviation, Desvio Padrão. Categorias dos antibióticos: 4. β -lactâmicos + inibidor: Amoxicilina + clavulanato e/ou Piperacilina + Tazobactam; 5. Cefalosporinas de 3a geração: Ceftriaxona; 6. Cefalosporinas de 4a geração: Cefepime; 7. Carbapenêmicos: Meropenem, Imipenem e/ou Ertapenem; 8. Aminoglicosídeos: Amicacina e/ou Gentamicina; 9. Glicopeptídeos: Vancomicina e/ou Teicoplanina; 10. Fluorquinolonas: Ciprofloxacino e/ou Levofloxacino; 11. Tratamento não inclui pacientes colonizados, a frequência foi calculada considerando n=20. 12. UTI, Unidade de Terapia Intensiva. 13. Outras co-morbidades: Tabagismo, doença pulmonar, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

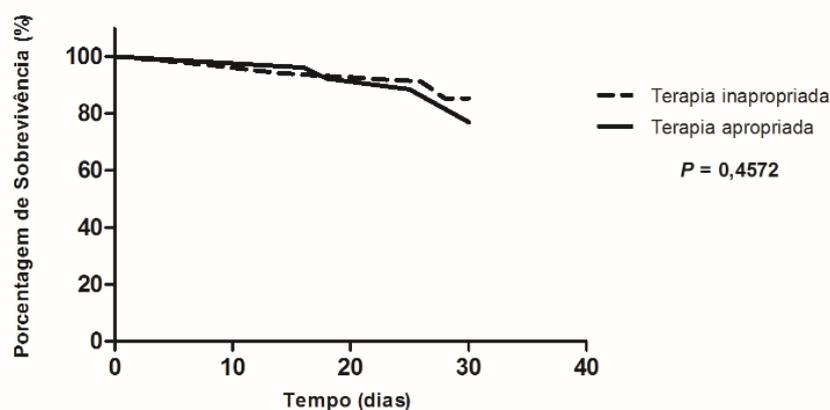


Figura 2: Curva de sobrevivência dos pacientes infectados por *K. pneumoniae* que receberam terapia antimicrobiana inapropriada em relação ao grupo que recebeu terapia apropriada, considerando mortalidade em 30 dias.

A tabela 2 apresenta a caracterização das amostras de *K. pneumoniae* quanto a data do isolamento, dados clínicos, evolução clínica do paciente, sítio de infecção bem como o fenótipo de multirresistência. A resistência foi observada para os diferentes antimicrobianos testados, com a multirresistência com frequências elevadas entre as amostras, 50% entre as KpSC e 100% das KpRC, incluindo resistência a polimixina B.

Tabela 2: Caracterização das amostras de *K. pneumoniae* quanto a data do isolamento, clínica, evolução clínica do paciente, sítio de isolamento, perfil de resistência e fenótipo de multirresistência.

(continua)

Fenótipo ¹	Amostra (n=60)	Data de Isolamento	Clínica/Setor ²	Evolução clínica	Sítio de isolamento	Perfil de Resistência ³	MDR ⁴
Infecções por KpSC (n=30)	Kp 3 Ξ	12.06.2009	CM	Óbito	Sangue	B+I; CEF; AMN; FLR	MDR
	Kp 11 Ξ ≠ Ω	09.07.2009	CC	Alta	Urina	B+I; CEF	não-MDR
	Kp 13 Ξ	20.07.2009	CM	Alta	Sangue	B+I; CEF; AMN; FLR	MDR
	Kp 20 Ξ	01.08.2009	CC	Alta	Sangue	B+I; CEF	não-MDR
	Kp 22 Ξ	05.08.2009	CC	Alta	Pulmão	B+I; CEF; FLR	MDR
	Kp 30 Ξ ≠ Ω	15.08.2009	CM	Alta	Pulmão	B+I; CEF; AMN; FLR	MDR
	Kp 34 Ξ	17.08.2009	Emer	Óbito	Urina	B+I; CEF; AMN; FLR	MDR
	Kp 37 Ξ ≠ Ω	18.08.2009	CM	Alta	Sangue	B+I; CEF; AMN; FLR	MDR
	Kp 39 Ξ	19.08.2009	Emer	Óbito	Urina	B+I; CEF; AMN; FLR	MDR
	Kp 57 Ξ	16.09.2009	CM	Óbito	Sangue	CEF; AMN; FLR	MDR
	Kp 60 Ξ ≠ Ω	14.09.2009	Emer	Alta	Urina	CEF	não-MDR
	Kp 61 Ξ	23.09.2009	T	Alta	Urina	CEF	não-MDR
	Kp 64 Ξ	01.10.2009	Ped	Alta	Sangue	CEF	não-MDR
	Kp 67	02.10.2009	CM	Alta	Urina	CEF; AMN; FLR	MDR
	Kp 71 Ξ	05.10.2009	Ped	Alta	Sangue	CEF	não-MDR
	Kp 84 Ξ	20.10.2009	CC	Óbito	Pulmão	CEF; FLR	não-MDR
	Kp 102	16.11.2009	CC	Alta	Urina	CEF; AMN; FLR	MDR
Kp 109 Ξ ≠ Ω	12.11.2009	Emer	Óbito	Sangue	CEF; AMN; FLR	MDR	

Tabela 2: Caracterização das amostras de *K. pneumoniae* quanto a data do isolamento, clínica, evolução clínica do paciente, sítio de isolamento, perfil de resistência e fenótipo de multirresistência.

							(continuação)
Fenótipo ¹	Amostra (n=60)	Data de Isolamento	Clínica/Setor ²	Evolução clínica	Sítio de isolamento	Perfil de Resistência ³	MDR ⁴
Infecções por KpSC (n=30)	Kp 112	10.11.2009	T	Alta	Sangue	CEF	não-MDR
	Kp 114	30.11.2009	CM	Alta	Sangue	CEF	não-MDR
	Kp 117 ¥	20.11.2009	Emer	Óbito	Sangue	CEF; AMN	não-MDR
	Kp 119	05.12.2009	Emer	Alta	Sangue	CEF; AMN; FLR	MDR
	Kp 120	06.12.2009	CC	Alta	Sangue	CEF	MDR
	Kp 124	09.12.2009	UTI	Alta	Pulmão	CEF; AMN; FLR	não-MDR
	Kp 129 ¥ ≠	01.01.2010	CC	Alta	Sangue	CEF; AMN	não-MDR
	Kp 131 ¥	30.12.2009	UTI	Óbito	Sangue	CEF; AMN	não-MDR
	Kp 133 ¥	30.12.2009	UTI	Alta	Urina	CEF; FLR	não-MDR
	Kp 151	13.01.2010	CC	Alta	Urina	CEF; AMN; FLR	MDR
	Kp 179	05.03.2010	MI	Alta	Sangue	CEF; FLR	não-MDR
Kp 186	08.03.2010	CC	Alta	Sangue	CEF; AMN; FLR	MDR	
Infecções por KpRC (n=20)	KPC 00 ¥	10.07.2012	n.e.	Alta	Urina	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP	MDR
	KPC 01 ¥	13.04.2013	n.e.	Alta	Urina	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP	MDR
	KPC 02 ¥ ≠ Ω	22.05.2013	UTI-HM	Alta	Sangue	B+I; CEF; FLR; CBP	MDR
	KPC 03 ¥ ≠ Ω	25.05.2013	UTI-HM	Alta	Urina	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP	MDR
	KPC 06	25.09.2014	Onco	Óbito	Sangue	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP	MDR
	KPC 07	30.10.2014	Onco	Óbito	Sangue	B+I; CEF; FLR; CBP	MDR
	KPC 08	09.11.2014	CC	Óbito	Pulmão	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP	MDR

Tabela 2: Caracterização das amostras de *K. pneumoniae* quanto a data do isolamento, clínica, evolução clínica do paciente, sítio de isolamento, perfil de resistência e fenótipo de multirresistência.

(continuação)

Fenótipo ¹	Amostra (n=60)	Data de Isolamento	Clínica/Setor ²	Evolução clínica	Sítio de isolamento	Perfil de Resistência ³	MDR ⁴
Infecções por KpRC (n=20)	KPC 09	11.11.2014	UTI	Óbito	Pulmão	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP	MDR
	KPC 10	04.12.2014	Emer	Óbito	Sangue	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP	MDR
	KPC 11	22.01.2015	UTI	Óbito	Sangue	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP	MDR
	KPC 12	02.02.2015	Emer	Óbito	Sangue	B+I; CEF; AMN; FLR; GLI; CBP	MDR
	KPC 13 ¥ Ω	18.03.2015	UTI	Óbito	Líquor	B+I; CEF; FLR; CBP; POL	MDR
	KPC 14	06.04.2015	UTI	Óbito	Líquor	B+I; CEF; FLR; CBP	MDR
	KPC 15	08.04.2015	Emer	Óbito	Sangue	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP	MDR
	KPC 16	21.04.2015	UTI	Óbito	Sangue	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP	MDR
	KPC 18 ¥	27.05.2015	UTI	Alta	Pulmão	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP; POL	MDR
	KPC 19 ¥	26.06.2015	UTI	Óbito	Pulmão	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP; POL	MDR
	KPC 20 ¥	25.06.2015	UTI	Óbito	Pulmão	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP; POL	MDR
	KPC 21 ¥	25.06.2015	UTI	Óbito	Sangue	B+I; CEF; FLR; CBP; POL	MDR
	KPC 23 ¥ Ω	14.07.2015	CC	Óbito	Urina	B+I; CEF; CBP; GLI; POL	MDR

Tabela 2: Caracterização das amostras de *K. pneumoniae* quanto a data do isolamento, clínica, evolução clínica do paciente, sítio de isolamento, perfil de resistência e fenótipo de multirresistência.

							(conclusão)
Fenótipo ¹	Amostra (n=60)	Data de Isolamento	Clínica/Setor ²	Evolução clínica	Sítio de isolamento	Perfil de Resistência ³	MDR ⁴
Colonizações por KpRC (n=10)	KPC 04 ¥ ‡	07.07.2014	UTI	Alta	Mucosa anal	B+I; CEF; CBP	MDR
	KPC 05 ¥ ‡ Ω	07.07.2014	UTI	Óbito	Mucosa anal	B+I; CEF; FLR; CBP	MDR
	KPC 17	26.05.2015	UTI	Alta	Mucosa anal	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP	MDR
	KPC 22 ¥	02.07.2015	UTI	Óbito	Mucosa anal	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP; POL	MDR
	KPC 24 ¥	15.07.2015	UTI	Alta	Mucosa anal	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP; POL	MDR
	KPC 25 ¥	15.07.2015	UTI	Alta	Mucosa anal	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP; POL	MDR
	KPC 26 ¥	14.07.2015	UTI	Alta	Mucosa anal	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP; POL	MDR
	KPC 27	21.07.2015	UTI	Óbito	Mucosa anal	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP; POL	MDR
	KPC 28	28.07.2015	UTI	Óbito	Mucosa anal	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP	MDR
	KPC 29	31.07.2015	UTI	Alta	Mucosa anal	B+I; CEF; AMN; FLR; CBP	MDR

Símbolos: ¥ amostras de *K. pneumoniae* avaliadas no PFGE; ‡ amostras avaliadas para produção de biofilme; Ω sequenciamento MLST. 1. **KpSC:** Amostras de *K. pneumoniae* sensíveis aos carbapenêmicos; **KpRC:** Amostras de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos. 2. CM: Clínica Médica; CC: Clínica Cirúrgica; Emer: Emergência; T: Transplante; Ped: Pediatria; UTI: Unidade de Terapia Intensiva; UTI-HM: Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Municipal de Uberlândia; MI: Moléstia Infecciosa; Onco: Oncologia; n. e.: não especificado. 3. Categorias dos antibióticos: β-lactâmicos + inibidor de β-lactamase: Amoxicilina + clavulanato e/ou Piperacilina + Tazobactam; Cefalosporinas 2^a, 3^a e/ou 4^a geração: Cefoxitina, Ceftriaxona, Cefotaxima e/ou Cefepime; Aminoglicosídeos: Amicacina e/ou Gentamicina; Fluorquinolonas: Ciprofloxacino e/ou Levofloxacino; Carbapenêmicos: Meropenem, Imipenem e/ou Ertapenem; Gliciliclinas: Tigeciclina; Polimixinas: Colistina (Polimixina E). **SIGLAS:** β-lactâmicos + inibidor de β-lactamase (B+I); Cefalosporinas 2^a, 3^a e/ou 4^a geração (CEF); Aminoglicosídeos (AMN); Fluorquinolonas (FLR); Carbapenêmicos (CBP), Gliciliclinas (GLI) e Polimixinas (POL). 4. MDR: *multidrug-resistant*, multirresistente.

A técnica de PCR para os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{CTX-M} foi realizada para todas as amostras, sendo que 48 (80%) apresentaram amplicon para o gene *bla*_{CTX-M}, enquanto o gene *bla*_{KPC} foi detectado apenas nas amostras resistentes aos carbapenêmicos, ou seja, todas as amostras selecionadas para esse grupo confirmaram a presença do gene *bla*_{KPC} (Tabela 3). Em função do custo, foram selecionadas 6 amostras contendo o gene *bla*_{KPC} para o sequenciamento da variante alélica do gene, e todas confirmaram ser da variante *bla*_{KPC-2} (APÊNDICE I). No total de amostras resistentes aos carbapenêmicos, 27 (90%) também apresentaram o gene *bla*_{CTX-M}. Adicionalmente, foi realizado PCR para detecção dos genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} no grupo KpSC, e foi observado presença dos genes em 73% das amostras (dados não demonstrados).

Tabela 3: Caracterização das cepas clínicas de *K. pneumoniae* sensíveis e resistentes aos carbapenêmicos com base em características genotípicas relacionadas à resistência e virulência.

(continua)

Fenótipos ¹	Amostras (n=60)	Presença dos genes de resistência ²	Presença dos genes de virulência ³
		<i>bla</i> _{CTX-M} ; <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>iucC</i> , <i>rmpA</i> , <i>ecpA</i> , <i>mrkD</i> , <i>khe</i>
Infecções por KpSC (n=30)	Kp 3	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>ecpA</i>
	Kp 11	-	<i>fimH</i> , <i>wab</i> , <i>ecpA</i>
	Kp 13	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>ecpA</i>
	Kp 20	-	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>ecpA</i> , <i>khe</i>
	Kp 22	-	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>ecpA</i> , <i>khe</i>
	Kp 30	-	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>ecpA</i>
	Kp 34	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>ecpA</i> , <i>khe</i>
	Kp 37	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>ecpA</i> , <i>khe</i>
	Kp 39	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>fimH</i> , <i>wabG</i> , <i>ecpA</i> , <i>khe</i>
	Kp 57	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>ecpA</i>
	Kp 60	-	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>ecpA</i>
	Kp 61	-	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>ecpA</i>
	Kp 64	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>khe</i>
	Kp 67	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>ecpA</i>
	Kp 71	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>fimH</i> , <i>wabG</i> , <i>khe</i>
	Kp 84	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>iucC</i>
	Kp 102	-	<i>fimH</i> , <i>wabG</i>
	Kp 109	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>iucC</i> , <i>khe</i>
	Kp 112	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>
	Kp 114	-	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>
	Kp 117	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>fimH</i> , <i>wabG</i> , <i>khe</i>
	Kp 119	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>
	Kp 120	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>
	Kp 124	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>
	Kp 129	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>ecpA</i>
	Kp 131	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>iucC</i>
	Kp 133	<i>bla</i> _{CTX-M}	-
	Kp 151	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>ecpA</i>
	Kp 179	-	<i>iucC</i> , <i>ecpA</i>
	Kp 186	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>iucC</i> , <i>ecpA</i>

Tabela 3: Caracterização das cepas clínicas de *K. pneumoniae* sensíveis e resistentes aos carbapenêmicos com base em características genotípicas relacionadas à resistência e virulência.

		(conclusão)		
Fenótipos ¹	Amostras (n=60)	Presença dos genes de resistência ²	Presença dos genes de virulência ³	
		<i>bla</i> _{CTX-M} ; <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>iucC</i> , <i>rmpA</i> , <i>ecpA</i> , <i>mrkD</i> , <i>khe</i>	
Infecções por KpRC (n=20)	KPC 00	<i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>wabG</i> , <i>khe</i>	
	KPC 01	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>iucC</i>	
	KPC 02	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
	KPC 03	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>iucC</i>	
	KPC 06	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>wabG</i>	
	KPC 07	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
	KPC 08	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
	KPC 09	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>wabG</i>	
	KPC 10	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
	KPC 11	<i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
	KPC 12	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>wabG</i>	
	KPC 13	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
	KPC 14	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
	KPC 15	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
	KPC 16	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
	KPC 18	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
	KPC 19	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
	KPC 20	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
	KPC 21	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
	KPC 23	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
	Colonizações por KpRC (n=10)	KPC 04	<i>bla</i> _{KPC}	<i>wabG</i> , <i>ecpA</i>
		KPC 05	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i> , <i>ecpA</i> , <i>khe</i>
		KPC 17	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>
KPC 22		<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
KPC 24		<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
KPC 25		<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
KPC 26		<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
KPC 27		<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
KPC 28		<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	
KPC 29		<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH</i> , <i>fimA</i> , <i>wabG</i>	

1. KpSC: Amostras de *K. pneumoniae* sensíveis aos carbapenêmicos; KpRC: Amostras de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos; 2. Genes de resistência: *bla*_{CTX-M}, gene codificador da beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) tipo CTX-M; *bla*_{KPC}, gene codificador da carbapenemase KPC. (-) significa negativo para o gene avaliado. 3. Genes de virulência: *fimH*, codificam fimbrias do tipo 1; *fimA*, codificam fimbrias do tipo 3; *wabG* e *rmpA*, codificam cápsula polissacarídica; *iucC*, codifica sistema de aquisição de ferro; *ecpA*, adesina *E. coli* "Common Pilus"; *mrkD*, codificam fimbrias do tipo 3; *khe*, codifica hemolisinas.

A presença dos genes de virulência (*fimH*, *fimA*, *ecpA*, *wabG*, *khe*, *iucC*, *mrkD* e *rmpA*) entre os dois grupos de amostras (KpSC e KpRC) foi frequente em ambos os grupos. Entretanto, entre aquelas KpRC predominaram os genes *fimH*, *fimA* e *wabG* (83%). No total, 90% foram positivas para o gene *wabG*, 88% para o gene *fimH*, 75% para *fimA*, 32% para *ecpA*, 17% para *khe* e 13% para *iucC*. As combinações *fimH*⁺ *fimA*⁺ *wabG* e *fimH*⁺ *fimA*⁺ *wabG*⁺ *ecpA* foram as mais prevalentes, detectadas em 26 (43,3%) e 6 (10%) amostras, respectivamente. As amostras provenientes de colonização apresentaram um perfil semelhante as amostras de infecção, ou seja 80% delas apresentaram os genes *fimH*, *fimA* e *wabG*. Os genes *rmpA* e *mrkD* não foram detectados em nenhuma das amostras testadas.

Todos os pacientes utilizaram algum antibiótico durante a internação, sendo que a maioria (73%) utilizaram mais de dois fármacos. Os dados de consumo de cefalosporinas de 3^a e 4^a gerações, carbapenêmicos, fluorquinolonas e polimixina B, em DDD por 1000 pacientes-dia estão na tabela 4. O consumo destes antibióticos, durante o período investigado, variou nos intervalos considerados, entretanto, o uso de cefepime e ceftriaxona, com média de 1738,7 e 1031,5 DDD por 1000 pacientes-dia, respectivamente, sobressaíram em relação ao de meropenem (479,4 DDD por 1000 pacientes-dia) e ciprofloxacino (155,4 DDD por 1000 pacientes-dia). Verificou-se aumento de DDD para polimixina B a partir do ano 2014, relacionado a emergência de amostras com resistência a este antimicrobiano (Figura 3, Tabela 4). Em resumo, o consumo foi alto de cefepime, ceftriaxona e carbapenêmicos, com tendência crescente durante o período de 2009-2013, e estabilização nos três últimos anos (2014-2016) em valores elevados. Estatisticamente não houve correlação significativa entre o número de casos de infecções por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL e KPC entre os anos de 2009 a 2016 e o aumento do uso dos antimicrobianos.

Tabela 4. Média da somatória do consumo de antibióticos em DDD/1000 pacientes-dia para: imipenem, meropenem, cefepime, ceftriaxona, ciprofloxacino, levofloxacino e polimixina B no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, nos anos de 2009 a 2016.

Antibióticos	2009 - 2016								Média
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	
Imipenem	114,9	274,3	222,2	232,5	450,5	183,7	160,0	133,0	221,4
Meropenem	362,7	306,2	300,5	406,2	828,6	544,6	399,6	686,5	479,4
Cefepime	892,2	1746,3	1771,7	2075,0	3570,7	1147,2	1304,8	1401,7	1738,7
Ceftriaxona	651,1	1068,9	969,8	1231,9	1924,6	872,1	857,5	675,9	1031,5
Ciprofloxacino	64,7	124,0	124,1	216,2	215,8	212,9	155,2	129,9	155,4
Levofloxacino	14,0	54,1	22,7	125,8	43,2	88,7	52,2	84,3	60,6
Polimixina B	*	*	134,0	180,0	19,5	153,9	135,0	193,0	135,9

*não utilização de Polimixina B no HC-UFU

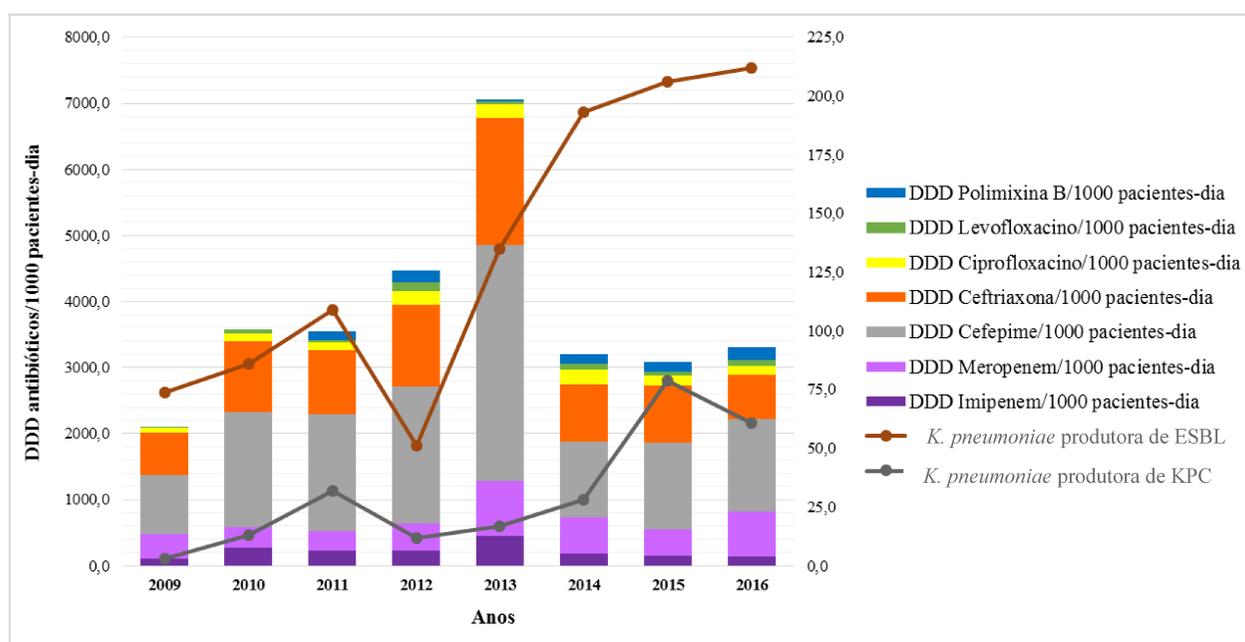


Figura 3. Dose diária definida dos antimicrobianos por 1000 pacientes-dia no HC-UFU no período de 2009 a 2016 e a correlação com as taxas de ESBL e KPC.

As características das 36 amostras que foram selecionadas aleatoriamente para a avaliação da clonalidade por PFGE estão na tabela 2. A necessidade de parte da seleção de amostras para esses experimentos se deu em função dos custos financeiros. Estão também indicadas as amostras selecionadas para o sequenciamento por MLST e formação de biofilmes. Para os dois últimos experimentos foram utilizadas amostras representativas de cada um dos clones detectados. Os resultados obtidos geraram o dendrograma de similaridade genética apresentado na figura 4. No total, foram encontrados 28 perfis genotípicos distintos de *Klebsiella pneumoniae* diferenciadas entre si por um coeficiente de similaridade acima de 85% e apenas os clones A, B, C, D, E, F apresentaram duas amostras cada, observando-se disseminação policlonal de *K. pneumoniae* no período da investigação.

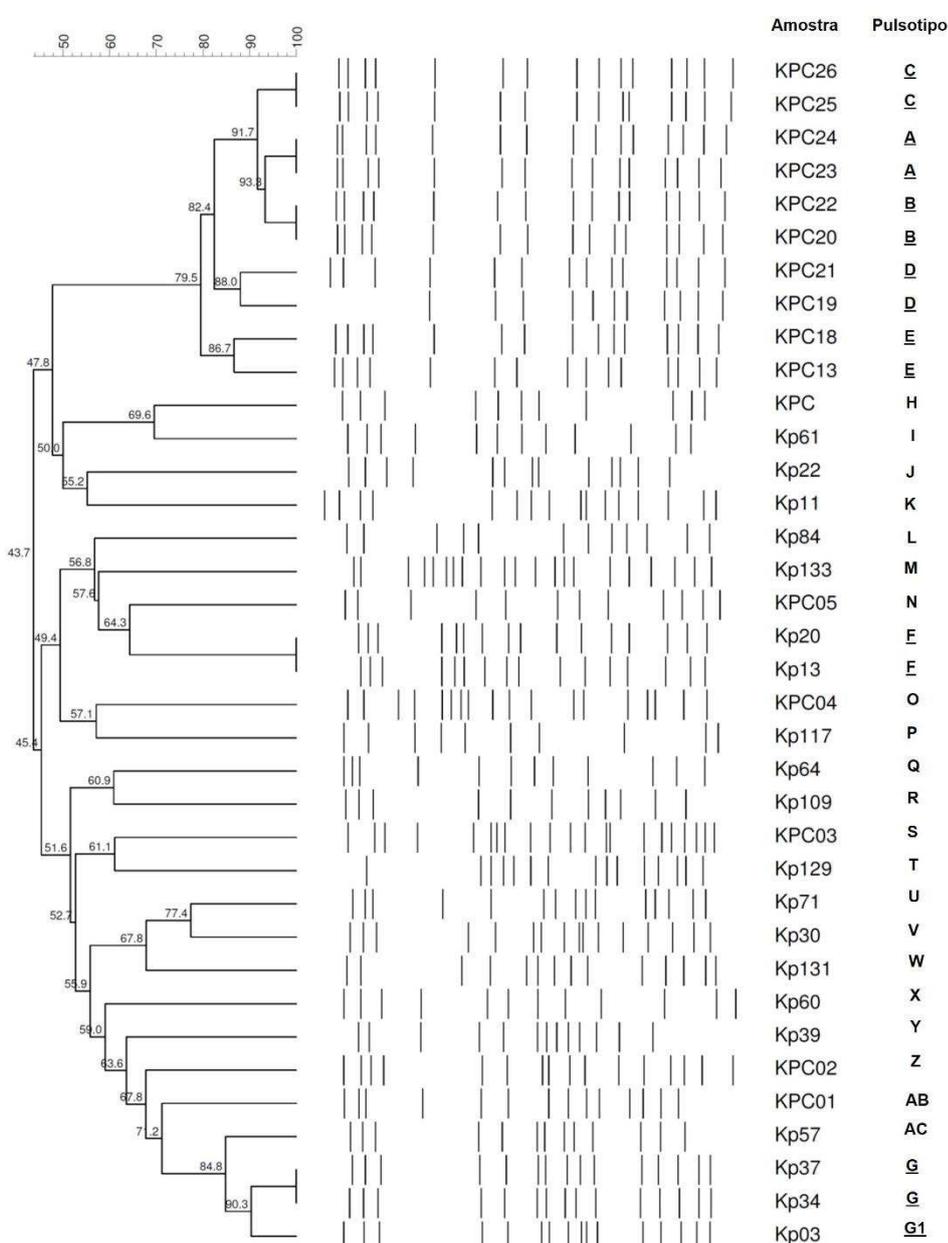


Figura 4. Dendrograma gerado por análise computadorizada de perfis clonais de DNA de 36 amostras clínicas de *K. pneumoniae* baseado na eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). A análise foi realizada pelo método de Dice/UPGMA (similaridade $\geq 85\%$).

A partir dos resultados do MLST foi construída a figura 5, que mostra a população *snapshot* dos STs de *K. pneumoniae* descritos até o momento, evidenciando a similaridade entre os STs e a indicação daqueles detectados neste estudo. A tabela 5 mostra as combinações dos genes que deram origem aos STs.

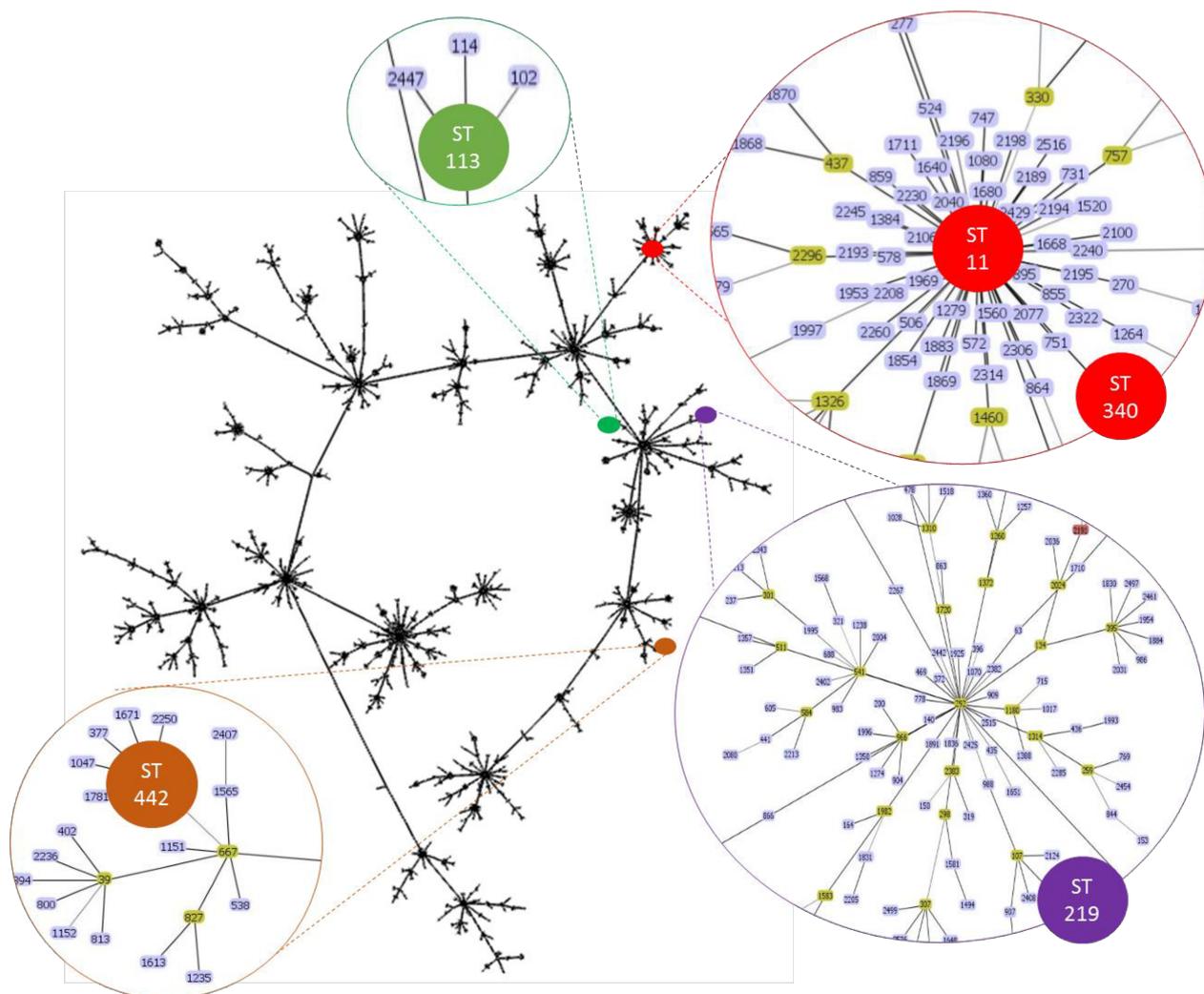


Figura 5. Diagrama construído através do goeBURST (PHYLOVIZ Online) indicando a similaridade entre os STs. Os STs observados no presente estudo estão ampliados e destacados por cores.

Tabela 5. Alelos dos STs das amostras de *K. pneumoniae* sensíveis e resistentes aos carbapenêmicos.

Fenótipo ¹	Amostras	ST	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>
KpSC	Kp11	113	14	1	2	1	21	1	23
	Kp30	340	3	3	1	1	1	1	18
	Kp37	340	3	3	1	1	1	1	18
	Kp60	219	2	1	2	3	27	1	39
	Kp109	340	3	3	1	1	1	1	18
KpRC	KPC02	340	3	3	1	1	1	1	18
	KPC03	442	10	20	2	1	9	11	14
	KPC05	11	3	3	1	1	1	1	4
	KPC13	11	3	3	1	1	1	1	4
	KPC23	11	3	3	1	1	1	1	4

1. **KpSC**: Amostras de *K. pneumoniae* sensíveis aos carbapenêmicos; **KpRC**: Amostras de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos.

Os resultados da tabela 6 mostram predominância das linhagens ST340 (40%) e ST11 (30%), seguindo-se o ST113 (10%), ST219 (10%) e ST442 (10%). ST340 e ST11 pertencem ao complexo clonal CC258, ST113 ao CC292, ST219 ao CC107 e ST442 ao CC667. Em relação ao ST340, foi observada produção moderada de biofilme em 3 das 4 amostras avaliadas, sendo considerada fraca produtora uma amostra resistente aos carbapenêmicos.

Na avaliação da formação de biofilme, além da tipagem genética por PFGE, as amostras foram selecionadas de acordo com a frequência de genes de virulência. Todas as amostras de *K. pneumoniae* avaliadas foram capazes de aderir a uma superfície de poliestireno não modificada. No entanto, a análise estatística evidenciou que três delas apresentaram taxas significativamente mais altas ($p < 0.001$) de adesão do que as demais. Estas três amostras não apresentaram o gene *bla*_{KPC}. (Fig. 6a).

Comparados ao controle, todas as amostras de *K. pneumoniae* apresentaram contagem de células viáveis após 24 horas de incubação na estufa, sem diferenças significativas (Fig. 6b). Além disso, quatro amostras apresentaram valores de biomassa superiores ao *cut-off* calculado de acordo com os critérios estabelecidos por Saxena et al. (2014) e apenas a amostra Kp 129 foi caracterizada como não-produtora de biofilme (0.081 ± 0.0476) (Figura 6c).

Tabela 6. Produção de biofilme, multiresistência e perfil genético das amostras de *K. pneumoniae*.

Amostras (n=12)	D.O. ¹	Produção de biofilme	Fenótipo de Resistência ²	PFGE ³	ST ⁴	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{KPC}	Genótipo de virulência ⁵
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044 (cepa controle)	0,57	Fraco	MDR	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Kp 11	0,51	Fraco	não-MDR	K	113	-	-	<i>fimH, wab, ecpA</i>
Kp 30	0,88	Moderado	MDR	V	340	-	-	<i>fimH, fimA, wabG, ecpA</i>
Kp 37	0,86	Moderado	MDR	G	340	<i>bla</i> _{CTX-M}	-	<i>fimH, fimA, wabG, ecpA, khe</i>
Kp 60	0,86	Moderado	não-MDR	X	219	-	-	<i>fimH, fimA, wabG, ecpA</i>
Kp 109	0,94	Moderado	MDR	R	340	<i>bla</i> _{CTX-M}	-	<i>fimH, fimA, wabG, iucC, khe</i>
Kp 129	0,08	Não-produtor	não-MDR	T	n.d.	<i>bla</i> _{CTX-M}	-	<i>ecpA</i>
KPC 02	0,48	Fraco	MDR	Z	340	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>fimH, fimA, wabG</i>
KPC 03	0,4	Fraco	MDR	S	442	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>fimH, fimA, wabG, iucC</i>
KPC 04	0,31	Fraco	MDR	O	n.d.	-	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>wabG, ecpA</i>
KPC 05	0,59	Fraco	MDR	N	11	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>fimH, fimA, wabG, ecpA, khe</i>
KPC13	n.d.	n.d.	MDR	n.d.	11	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH, fimA, wabG</i>
KPC23	n.d.	n.d.	MDR	n.d.	11	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>fimH, fimA, wabG</i>

1. Média da densidade óptica; 2. MDR: *multidrug-resistance*, multiresistente; 3. PFGE: Eletroforese em gel em campo pulsado; 4. ST: *Sequence Type*. 5. Genes de virulência: *fimH*, codifica fimbrias do tipo 1; *fimA*, fimbrias do tipo 3; *wabG* e *rmp*, cápsula polissacarídica; *iucC*, sistema de aquisição de ferro; *ecpA*, adesina *E. coli* "*Common Pilus*"; *mrkD*, fimbrias do tipo 3; *khe*, hemolisinas. n.d. não determinado. (-) representa que a amostra foi negativa por PCR para o gene avaliado.

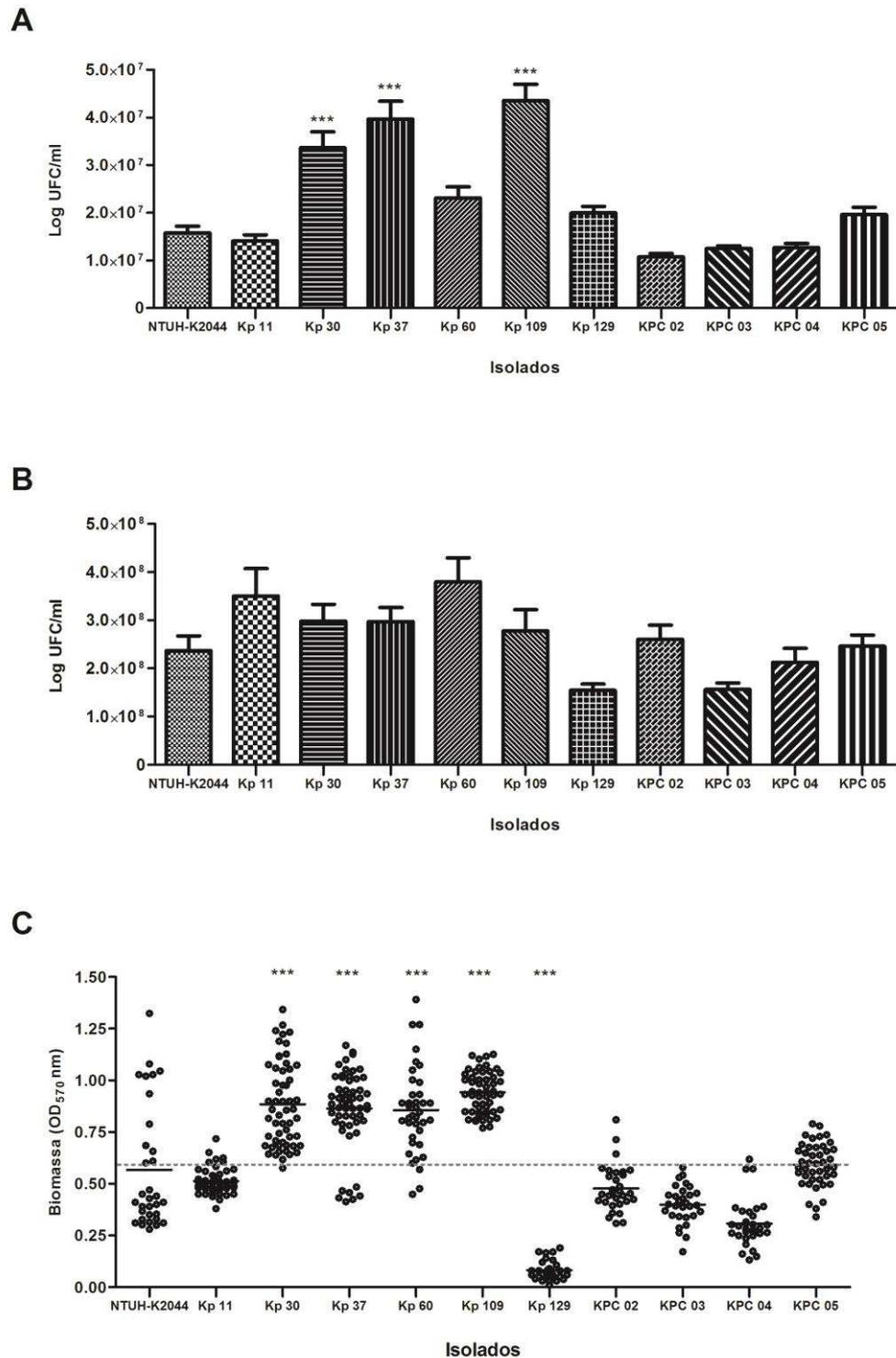


Figura 6: Avaliação do número de células aderidas, formação de biofilme e biomassa em 10 amostras de *K. pneumoniae*. a) Número de células aderidas a uma superfície de poliestireno após 2 horas de adesão, expressas como Log UFC/ml; b) Concentração celular do biofilme expresso como Log UFC/ml; c) Biomassa do biofilme expressa como densidade óptica do cristal violeta (DO_{570nm}). Resultados representam médias com desvio padrão (barras de erro) de três experimentos independentes. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, usando Kruskal-Wallis, Teste de comparação múltipla de Dunn. *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 foi utilizada como controle.

No total, 4 amostras (40%) mostraram produção moderada de biofilme, 6 (60%) produção fraca e uma foi negativa para este fenótipo (Tabela 6). As amostras de *K. pneumoniae* produtoras moderadas de biofilme, apresentavam pelo menos quatro genes de virulência. A relação genética entre as amostras e a possível associação com a habilidade de formar biofilme foi investigada por eletroforese em campo pulsado, no entanto, não houve relação entre a produção de biofilme e o pulsotipo determinado.

De acordo com os resultados da produção de biofilme e presença de genes de virulência e resistência, foram selecionadas para MEV as amostras Kp30, produtora moderada de biofilme, e KPC05, amostra resistente aos carbapenêmicos e produtora fraca de biofilme. As imagens de MEV retificaram a capacidade destas bactérias de aderir a superfície de placas de poliestireno. Nas figuras pôde-se observar que o crescimento bacteriano foi confluyente para a amostra que apresentou formação moderada de biofilme (Figs. 7b, c e d), com presença de matriz visível (Figs. 7b e d). Para a amostra considerada produtora fraca, essas características não foram detectadas (Figs. 8b, c e d).

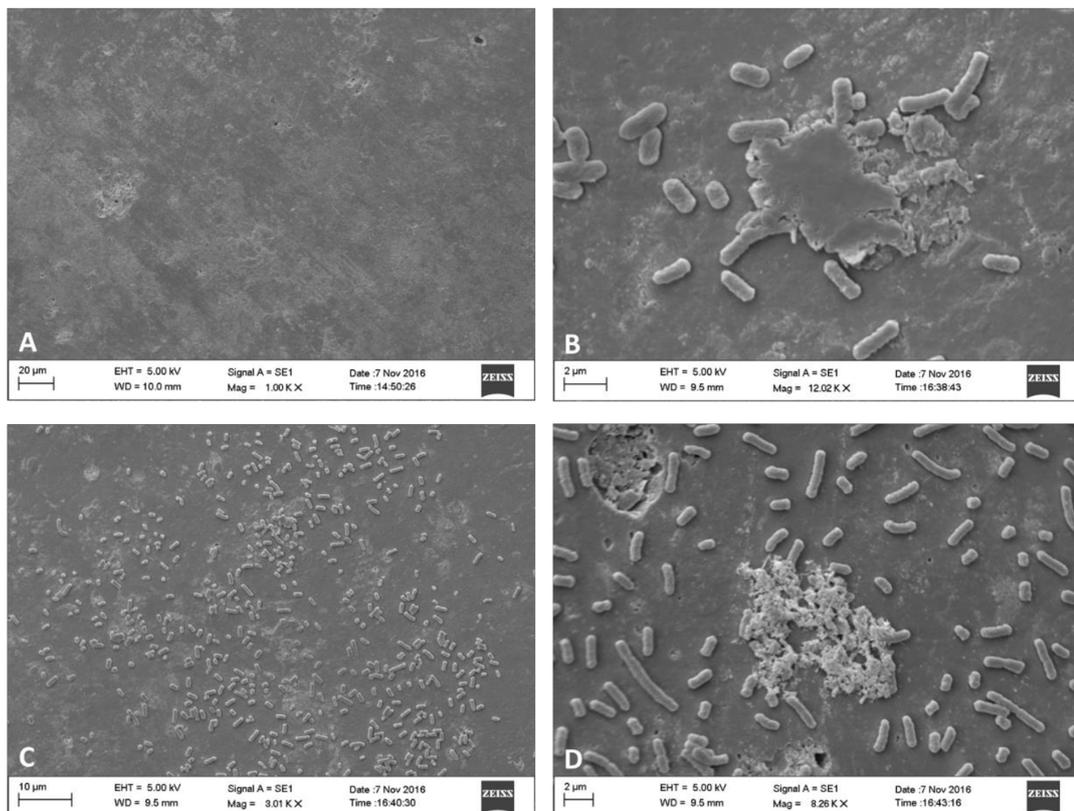


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura da formação de biofilmes da amostra clínica de *K. pneumoniae* Kp30, desenvolvidos na superfície de esferas de vidro após 24 horas de incubação. A) Controle negativo. B, C e D) Formação de biofilme e crescimento bacteriano da amostra Kp 30.

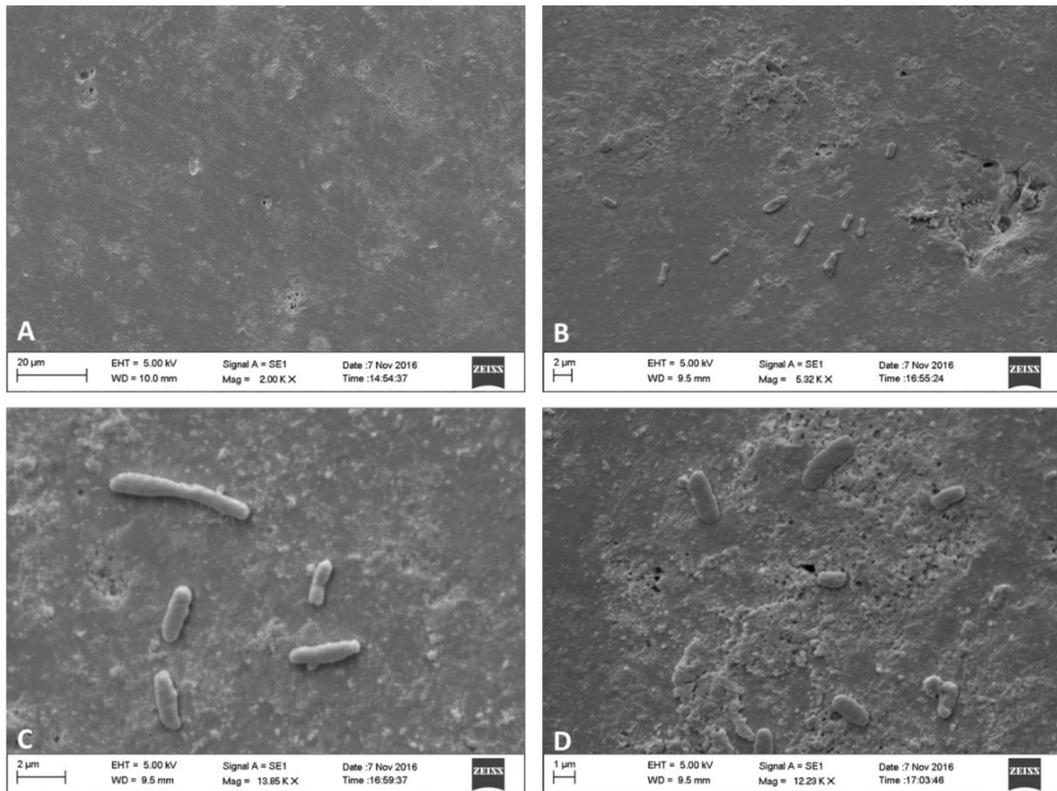


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura da formação de biofilmes da amostra clínica de *K. pneumoniae* KPC 05, desenvolvidos na superfície de esferas de vidro após 24 horas de incubação. A) Controle negativo. B, C e D) Formação de biofilme e crescimento bacteriano da amostra KPC 05.

Foram realizados experimentos de competição em pares, conforme descrito anteriormente no tópico metodologia, para estimar a aptidão relativa de três amostras de *K. pneumoniae*, a saber: uma resistente aos carbapenêmicos (KPC05), uma resistente aos carbapenêmicos e a polimixina B (KPC13) e a amostra ATCC 10031, sensível aos antibióticos.

Na comparação entre a amostra ATCC 10031 e a KPC05, observou-se que a primeira apresentou taxas mais significativas de crescimento ($p=0,0033$), a exemplo do observado quando de sua comparação com a KPC13, amostra resistente a polimixina B ($p=0,0128$) (Figs. 9a e b). No experimento de competição realizado entre as amostras KPC05 e KPC13, a última, resistente a polimixina B, apresentou taxas de crescimento mais significativas, com $p=0,0030$ (Fig. 9c).

Adicionalmente, os valores do índice de competição (IC) indicaram que KPC05 e KPC13 apresentaram significativamente menor aptidão quando co-cultivadas com a amostra sensível (valores de IC de 0,05 e 0,19 em 48 horas) (Fig. 9d), enquanto entre as duas amostras multirresistentes, a KPC05 mostrou um custo de *fitness* significativamente menor comparado com KPC13 (valores de IC, 0,07 em 48 horas, 0,2 em 72 horas).

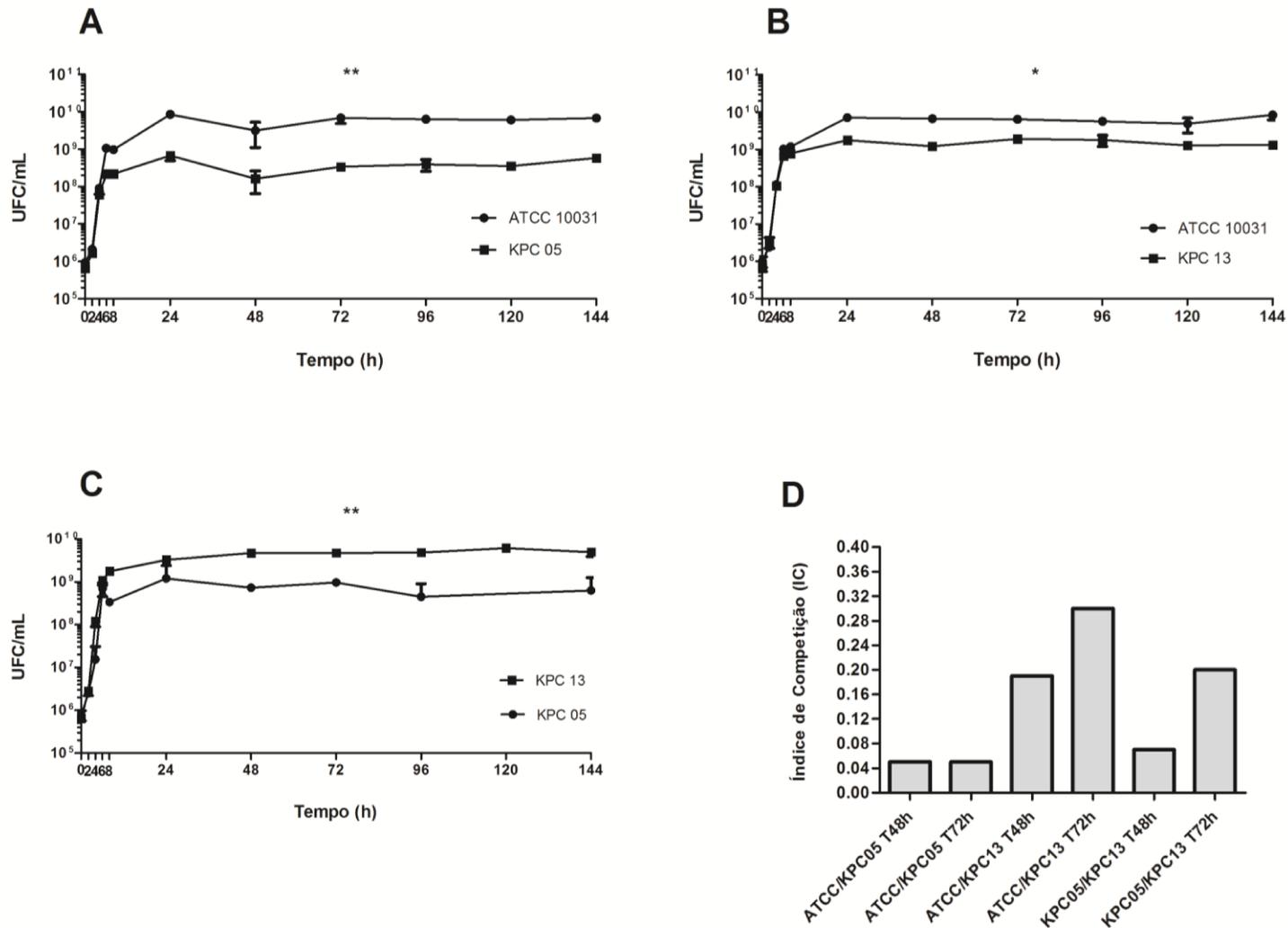


Figura 9: Custos do *fitness* bacteriano. *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (KPC05), *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e a polimixina B (KPC13) e a amostra ATCC 10031 multissensível. (A) Experimento de competição realizado entre a amostra ATCC 10031 e KPC05; (B) amostra ATCC 10031 com KPC13. (C) KPC05 com KPC13. (D) Valor de IC inferior a 1 indica um defeito de *fitness*, enquanto um valor maior que 1 indica um benefício (vantagem adaptativa) de *fitness*. As barras de erro indicam os desvios padrão para três amostras em triplicata.

5. DISCUSSÃO

A emergência e disseminação de genes associados à produção de β -lactamases de espectro ampliado e carbapenemases, principalmente em amostras clínicas de *K. pneumoniae*, representam ameaça considerável para a saúde pública (GUPTA et al., 2003; PITOUT, 2010; CAO et al., 2014). Esse estudo avaliou a presença dos genes *bla_{CTX-M}* e *bla_{KPC}*, bem como a disseminação de clones e STs em amostras de *K. pneumoniae* recuperadas de pacientes hospitalizados. Observou-se alta frequência de amostras contendo gene *bla_{CTX-M}* bem como do gene *bla_{KPC}*, este último entre aquelas resistentes aos carbapenêmicos, o que nos permitiu determinar se essas amostras clínicas estavam geneticamente relacionadas. Vale a pena ressaltar que frequências extremamente elevadas de amostras multirresistentes foram observadas nesse estudo, o que certamente pode ter complicado o tratamento das infecções em função da pouca disponibilidade de antimicrobianos que poderiam ser utilizados. Isso pode ser parcialmente explicado pelo fato de que amostras produtoras de β -lactamases de espectro ampliado, bem como aquelas produtoras de carbapenemases, são comumente resistentes a múltiplas drogas (GUPTA et al., 2003; PITOUT, 2010; CAO et al., 2014).

As infecções devido às amostras multirresistentes geralmente estão associadas a maiores taxas de morbidade e mortalidade bem como a custos elevados (BASSETTI, RIGHI, 2013; COLOMB-COTINAT et al., 2016; PARAMYTHIOTOU, ROUTSI, 2016). Embora não tenhamos avaliado a mortalidade de forma mais complexa, nosso estudo confirmou a noção de que pacientes que são infectados por esses fenótipos normalmente têm pior prognóstico. Isso pôde ser inferido pelas altas taxas de mortalidade total (45%), em que 56,7% dos pacientes receberam terapia inadequada, que é bem estabelecido na literatura como forte fator prognóstico para a mortalidade (DANTAS et al., 2014; SAVAGE et al., 2016). Semelhante aos nossos achados, estudos anteriores mostraram que a taxa de mortalidade para pacientes infectados por *K. pneumoniae* produtora de ESBL é maior (52%), quase duas vezes mais alta (29%) naqueles não infectados por micro-organismos resistentes (TUMBARELLO et al., 2006).

Vários estudos, incluindo o nosso, destacam a ideia de que a disseminação do gene *bla_{CTX-M}* ocorre frequentemente entre os micro-organismos da família Enterobacteriaceae, fazendo com que esses agentes se tornem importantes reservatórios desses genes para outras espécies, como por exemplo *Pseudomonas aeruginosa* (PICÃO et al., 2009; CASTANHEIRA et al., 2016; SUN et al., 2017). Vale ressaltar que entre os critérios de seleção para as amostras de *K. pneumoniae* sensíveis aos carbapenêmicos avaliadas no estudo, incluíram aquelas

resistentes a ceftazidima e/ou ceftriaxona, e isso pode ter feito com que as taxas de produção de CTX-M tenham sido superestimadas (PICÃO et al., 2009; CHEN et al., 2011).

Amostras de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, principalmente aquelas produtoras de KPC, estão entre as bactérias mais prevalentes que ameaçam a vida do paciente, devido a diminuição das opções de tratamento, altas taxas de mortalidade e disseminação em ambientes hospitalares (YAMAMOTO; POP-VICAS, 2014). A resistência destas bactérias aos carbapenêmicos aumentou significativamente na Europa, conforme relatado pelo ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*), variando de 4,6% em 2010 para 8,3% em 2013 (ECDC, 2014). Entre os países da América Latina, o Brasil relata frequências de 17,3% de amostras apresentando este perfil de resistência (JONES et al., 2013), considerados endêmicos nos hospitais brasileiros, particularmente naqueles terciários e de ensino, onde há relatos do aumento de surtos associados (GALES et al., 2012; AREND et al., 2015). No trabalho de Gonçalves et al. (2016) realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, foram descritos dois grandes surtos, um deles causado por amostras resistentes aos carbapenêmicos produtoras de KPC e outro por KPC positivas resistentes a colistina, sendo este último considerado o maior surto de *K. pneumoniae* resistentes a polimixina até agora relatado no Brasil. Ambos os surtos foram associados com consumo prévio de carbapenêmicos e, em menor grau, ao uso de colistina. Em outros países, surtos tão importantes quanto este também tem sido relatados e também relacionados com o aumento na prescrição de polimixinas, associados com pacientes em condições clínicas mais graves e submetidos a inúmeros procedimentos invasivos, favorecendo a emergência desses micro-organismos (BOGDANOVICH et al., 2011). Infelizmente, as polimixinas estão entre os poucos agentes que ainda retém alguma atividade contra micro-organismos resistentes aos carbapenêmicos, entretanto, o cenário hoje mundial é problemático considerando a emergência desses micro-organismos com resistência a essa última opção de tratamento.

Terapia com agentes antimicrobianos pode contribuir para aumento na colonização e infecção por micro-organismos resistentes; vários estudos concluíram que o consumo destes agentes é um forte indicador de aquisição de KPC (AHMED et al., 2014; LING et al., 2015). Cerca de 40,0% dos pacientes hospitalizados recebem antimicrobianos e em aproximadamente 50,0% dos casos o seu uso é desnecessário (MANDELL; BENNETT; DOLIN, 2005; FAIR; TOR, 2014). A terapia empírica, principalmente nas UTIs, é usada com a combinação de vários antibióticos com espectro de ação abrangente, possibilitando a emergência e disseminação de bactérias resistentes. Esses medicamentos exercem pressão seletiva e provocam impacto ecológico, havendo necessidade de medidas específicas para seu melhor controle nos hospitais

(VITRAT et al., 2014; KARAM et al., 2016). A avaliação do consumo de antibióticos no hospital é usualmente recomendada por órgãos como a Organização Mundial de Saúde (OMS) e NHSN (*National Healthcare Safety Network*) avaliando-se a Dose Diária Definida, o que permite comparar as taxas de microrganismos e seus fenótipos de resistência aos antibióticos, favorecendo o estabelecimento de relações úteis (CURTIS, MARRIOTT, LANGLEY, 2004).

Verificamos na nossa investigação que o consumo de cefalosporinas de 3^a e 4^a geração predominou entre as classes de antibióticos prescritas, com grandes variações no período observado, podendo refletir a alta frequência de amostras contendo o gene *bla_{KPC}* e *bla_{CTX-M}* no HC-UFU. No trabalho de Moreira et al. (2013), a pressão seletiva exercida por antibióticos mostrou ter um impacto sobre a disseminação de genes de resistência no ambiente hospitalar. Neste trabalho, bem como no de Gonçalves et al. (2016), o consumo tanto de carbapenêmicos quanto de colistina foi alto e muito maior do que o relatado em outros hospitais, incluindo de países europeus (DUMARTIN et al., 2010; GIANI et al., 2015). De modo geral, as DDDs de antibióticos encontradas foram bem mais altas quando comparadas com as de outros países, principalmente em relação ao uso de cefalosporinas e carbapenêmicos (MEYER et al., 2003; NISS, 2004). A necessidade de melhorar o uso de antibióticos é urgente em todo mundo e deve haver maior difusão dos programas de gerenciamento do uso dos mesmos nos hospitais (DIDIODATO et al., 2015). Entretanto, a mudança na política de uso de antibióticos nos hospitais representa um desafio de grande complexidade.

Além da força da pressão seletiva dos antimicrobianos, amplificada pelo uso empírico inadequado de antibióticos potentes e de amplo espectro, outros fatores também são importantes quando se trata da epidemiologia de infecções por essas bactérias, e pode-se destacar: pacientes críticos em áreas críticas, que muitas vezes são expostos a inúmeros procedimentos invasivos e frequentemente adquirem infecções associados difíceis de tratar; a mobilidade social atual com a facilidade de viagens aéreas internacionais predominantemente para o turismo, e mais recentemente associadas a grandes eventos, como a Copa do Mundo de 2014 e os Jogos Olímpicos de Verão no Rio de Janeiro em 2016; falha na implementação de práticas de prevenção e controle de infecções, justificada pela falta de recursos humanos, tanto em termos qualitativos como quantitativos; e não menos importante, a falta de recursos financeiros que contribuem significativamente para a transmissão intra e inter hospitalar de patógenos; e finalmente, a existência de clones que são capazes de apresentar melhor adaptação no ambiente hospitalar e capacidade de propagação mais rápida devido a sua aptidão no *fitness* para ajustar seu metabolismo a novos genes de origem exógena.

A disseminação mono ou policlonal causada por amostras desses micro-organismos foi descrita em hospitais de diversos países, e é usualmente caracterizada por disseminação rápida nas unidades (SOVEREIN et al., 2014; GERACI et al., 2015). Os resultados da tipagem por PFGE permitiram constatar que durante o período de estudo, a disseminação de amostras de *K. pneumoniae* foi policlonal. Percebeu-se que vários grupos clonais com perfis diferentes surgiam e desapareciam ao acaso, ao longo do período estudado. Vale ressaltar, por exemplo, que no caso de amostras pertencentes ao clone A, estão associados a fenótipos extremamente resistentes, incluindo à polimixina, descritos previamente, apresentando uma disseminação clonal na UTI do HC-UFU (GONÇALVES et al., 2016). Essas amostras apresentavam vários genes de resistência, incluindo *bla_{KPC}*. Este fato sugere que esses elementos podem favorecer a permanência desses clones no ambiente hospitalar, entretanto não podemos concluir se a presença desse clone é constante, uma vez que esteve relacionado a um surto com duração de apenas um mês.

Os resultados apresentados no presente trabalho estão de acordo com outros estudos no Brasil, que relatam a disseminação policlonal de amostras produtoras de *bla_{KPC}* (ANDRADE et al., 2011; SEKI et al., 2011). Adicionalmente, trabalhos com MLST mostraram que o CC258 (podendo ser também referenciado como CC11) apresenta-se disseminado nos hospitais brasileiros (ANDRADE et al., 2011; CERDEIRA et al., 2016). No nosso estudo também foi detectado a presença deste complexo clonal, associado aos STs 11 e 340.

O ST340, predominante neste trabalho, já foi detectado em amostras de *K. pneumoniae* isoladas em vários países, como Espanha, Coreia e Itália (SÁNCHEZ-ROMERO et al., 2011; KIM et al., 2013; DONATI et al., 2014). No Brasil, o primeiro relato foi feito por Pereira et al., (2013) em amostras dos estados de Alagoas, Distrito Federal, Espírito Santo e Piauí. Este ST foi relacionado com diferentes mecanismos de resistência, como a produção de KPC-2 (OLIVEIRA et al., 2014; PEREIRA et al., 2013), NDM-1 (PEIRANO et al., 2011; KIM et al., 2013) e VIM-1 (SÁNCHEZ-ROMERO et al., 2011). De acordo com a literatura, a detecção de amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 pertencentes ao complexo clonal 11, podem ser consideradas clones multirresistentes de alto risco, com potencial de disseminação ambiental e humana, principalmente no Brasil (OLIVEIRA et al., 2014). Neste trabalho, apesar do número pequeno de amostras avaliadas, não observou-se relação entre a presença do gene *bla_{KPC}* e o ST340, situação contrária ao observado na literatura (PEREIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; MARTINS et al., 2015). Atualmente existem 24 variantes de KPC descritas, sendo que KPC-2 é a mais frequentemente reportada no Brasil até o momento (SAMPAIO, GALES, 2016; LAHEY CLINIC, 2017). A presença da variante KPC-2 foi

confirmada no nosso estudo através do sequenciamento do gene *bla_{KPC}* em seis amostras. Apesar de não termos realizado o sequenciamento de todos os genes *bla_{KPC}*, acredita-se que este seja o perfil das demais amostras incluídas no estudo. Vale ressaltar ainda, que o gene *bla_{KPC}* não foi associado com clone específico, ou seja, vários clones de *K. pneumoniae* disseminam o gene *bla_{KPC}*, o que dificulta consideravelmente o controle de infecção.

No nosso trabalho foi observado também a presença do ST11, o qual foi descrito pela primeira vez por Diancourt et al. (2005) nos experimentos de padronização do MLST. De acordo com a literatura, esse ST tem sido associado a diferentes surtos bem como com a presença de diferentes genes de resistência em *K. pneumoniae* (LI et al., 2012). Relatado em diversos países como Argentina, Índia e Austrália (LASCOLS et al., 2013; SHOMA et al., 2014), no Brasil foi descrito pela primeira vez por Andrade et al. (2011) em amostras de Riberão Preto (SP) e por Seki et al. (2011) em amostras dos estados de Pernambuco e Minas Gerais. O ST11 foi associado com a produção da enzima CTX-M-15 (LASCOLS et al., 2013; VOULGARI et al., 2013) e também KPC-2 (LI et al., 2012; CASTANHEIRA et al., 2012). No nosso trabalho também foi observado que o ST11 pode estar relacionado com amostras produtoras de vários mecanismos de resistência, incluindo produção de ESBL e carbapenemase.

Os STs 442 e 219 já foram relatados também no Brasil desde 2011 (SEKI et al., 2011), sendo que este último muito mais esporadicamente (ANDRADE et al., 2015). O ST113 é relatado em poucas amostras clínicas no mundo, tendo sido detectado no Brasil em amostras isoladas de aves (FERREIRA et al., 2016). Juntos, esses resultados mostram que amostras de *K. pneumoniae* multirresistentes apresentam comportamento endêmico e possuem plasticidade no genoma, o que facilita a aquisição de diversos determinantes de resistência antimicrobiana, geralmente associado à transferência horizontal de genes (ARDUINO et al., 2012). No trabalho de Andrade et al. (2015), houve associação entre importantes fatores de virulência e a co-resistência no clone de alto risco internacional ST11 de *K. pneumoniae*, o que torna este patógeno bem sucedido em infecções e aponta para a rápida expansão e evolução deste clone multirresistente e virulento, levando a um fenótipo pan-resistente e bactérias persistentes no ambiente hospitalar.

A maioria das amostras clínicas de *Klebsiella* spp. produz uma cápsula polissacarídica envolvendo a superfície bacteriana. As cápsulas podem apresentar diferentes sorotipos e intensidades de virulência. Neste estudo, as amostras de *K. pneumoniae* não apresentavam o gene *rmpA*, regulador da síntese de exopolissacarídeos e responsável pelo fenótipo mucóide e invasivo de algumas amostras (FANG et al., 2007), com isso, as amostras não foram consideradas hipervirulentas. Outro aspecto importante é que a adesão da bactéria em

superfícies mucosas é uma etapa essencial para o desenvolvimento da infecção. Geralmente em bactérias Gram negativas, essa adesão é mediada por fímbrias do tipo 1 e/ou tipo 3 (NUNES, 2009; STAHLHUT et al., 2009; ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013) e 88,3% das amostras clínicas do estudo codificam para adesinas do tipo 1 e/ou tipo 3. Como mencionado na introdução, as adesinas do tipo 3 codificadas pelo gene *mrkD* promovem adesão da bactéria na ausência de manose e promovem a formação de biofilmes (JAGNOW; CLEGG, 2003). No nosso estudo, nenhuma das amostras apresentou amplicon do gene *mrkD*, entretanto, 9 entre 10 amostras avaliadas foram classificadas em fracas e/ou moderadas produtoras de biofilme, o que pode ser explicado pela presença de outros mecanismos associados com essa produção, que não a presença de fímbrias do tipo 3. Nesse caso, 31,7% apresentaram o gene *ecpA*, também relacionado a formação de biofilme (ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013).

O crescimento da bactéria nos tecidos do hospedeiro pode ser limitado pela disponibilidade de ferro livre, que é baixa, com isso, as bactérias secretam sideróforos com afinidade elevada para o ferro, garantindo seu fornecimento (USEIN et al., 2001; MIETHKE, MARAHIEL, 2007). No nosso estudo, apenas 7 amostras tiveram amplicon para a presença do gene *iucC* que codifica para uma aerobactina. Normalmente este gene está associado ao *rmpA*, o qual não foi detectado entre as amostras do estudo. No entanto, existem outros sistemas de aquisição de ferro que não foram pesquisados neste trabalho. Apesar de poucas amostras serem submetidas a tipagem molecular por MLST, todas as amostras não pertencentes ao CC258 foram negativas para o gene de virulência *khe*. No entanto a hemolisina, codificada por este gene, e o seu papel como fator de virulência em *K. pneumoniae* não se encontram plenamente estudados (NUNES, 2009). Outro gene avaliado neste trabalho foi o *wabG*, envolvido na síntese de lipopolissacarídeos, encontrado com alta frequência (90%) entre as amostras avaliadas, em acordo com resultados anteriormente publicados (CANDAN, AKSOZ, 2015; BARATI et al., 2016).

Atualmente em países em desenvolvimento como o Brasil, os bacilos Gram-negativos, incluindo *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* têm surgido como os principais agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde (FERREIRA et al., 2015; ROYER et al., 2015; GONÇALVES et al., 2016). Como foi mencionado anteriormente, pesquisas recentes têm demonstrado que amostras de *K. pneumoniae*, principalmente aquelas de origem hospitalar, podem apresentar múltiplos elementos genéticos móveis, que conferem resistência a diferentes classes de antimicrobianos (LIVERMORE, 2012; TACCONELLI et al., 2014; HAWKEY, 2015). Aliado a esses elementos, a presença de fatores de virulência e a capacidade de formar biofilme podem contribuir para a emergência e a

disseminação de fenótipos altamente adaptativos no ambiente hospitalar, como foi evidenciado nesse estudo (DONLAN, 2001; LEE et al., 2008). Apesar de todos esses fatores serem importantes, a formação de biofilme é crucial não só para a sobrevivência do micro-organismo no ambiente, mas também para o sucesso de bactérias patogênicas causarem infecção (VUOTTO et al., 2014).

Embora a literatura descreva diferentes modelos epidemiológicos para o estudo de biofilmes em amostras clínicas, pouca atenção tem sido dada ao papel significativo da formação de biofilme por esses patógenos. No nosso trabalho, foram selecionadas amostras de *K. pneumoniae* sensíveis e resistentes aos carbapenêmicos para o estudo de biofilmes, recuperadas tanto de infecção quanto colonização. Essas amostras foram selecionadas devido ao aumento significativo da resistência aos β -lactâmicos e carbapenêmicos observada no hospital em que o estudo foi realizado (MOREIRA et al., 2013; DANTAS et al., 2014; GONÇALVES et al., 2016).

Nossos dados indicam que amostras de *K. pneumoniae* apresentam diferentes habilidades de adesão às placas de poliestireno. Foi observada forte influência da virulência na formação de biofilmes nas amostras incluídas no estudo, ou seja, amostras mais virulentas mostraram maior produção de biofilme do que as menos virulentas, de acordo com os critérios estabelecidos. Entretanto, exceções foram observadas em algumas linhagens produtoras de KPC. Porém, alguns estudos como o de Naparstek et al. (2014) relatam a associação entre a virulência dessas amostras e a habilidade de formar biofilme, ou seja, *K. pneumoniae bla_{KPC}* positivas pertencentes ao ST258, não são fortemente produtoras de biofilme. Um outro aspecto que vale ressaltar é que, apesar de não ter sido observada relação clonal e a produção de biofilme, a literatura mostra que há sim uma relação significativa entre a formação de biofilme e o pulstipo em outras bactérias Gram-negativas, como *A. baumannii* (SANCHEZ et al., 2013). Entretanto, no nosso estudo, foi possível perceber uma estreita relação entre a maior presença de genes de virulência e o ST340.

Juntos, a literatura e este estudo, demonstram que a formação de biofilme é uma característica prevalente entre as amostras clínicas associadas com diferentes síndromes infecciosas (DONLAN, 2001; SANCHEZ et al., 2013; HOIBY et al., 2014). Isto é claro na literatura, que mostra que amostras recuperadas de tecidos profundos, ossos e do trato respiratório tem maior capacidade de formação de biofilme determinado por avaliação de cristal violeta, em comparação com amostras recuperadas de sangue e urina, por exemplo (SANCHEZ et al., 2013). Em estudo realizado por nossa equipe, publicado em 2016 por Batistão e colaboradores, foi relatada forte produção de biofilme em amostras clínicas de *Staphylococcus*

aureus recuperados do sítio cirúrgico, o que foi observado com menor frequência em amostras associados a outras infecções. Embora essas relações não tenham sido avaliadas no presente estudo, a alta frequência de amostras produtoras de biofilme foi encontrada em todas as amostras clínicas independentemente do sítio da infecção.

Atualmente, tem sido demonstrado algumas correlações entre a resistência aos antibióticos e a capacidade de formação de biofilme em amostras de *K. pneumoniae* e *A. baumannii* (SANCHEZ et al., 2013; VUOTTO et al., 2014; BOCANEGRA-IBARIAS et al., 2015). Por exemplo, o estudo de Yang e Zhang (2008) demonstrou a habilidade de 150 amostras de *K. pneumoniae* formar biofilme, avaliado pela técnica de cristal violeta, com associação significativa entre a formação de biofilme e a produção de ESBL, uma vez que entre as amostras produtoras de biofilme, 43,5% produziram ESBLs. Neste trabalho, das 10 amostras de *K. pneumoniae* avaliadas para produção de biofilme, seis apresentaram o gene *bla*_{CTX-M}, que foi encontrado em duas amostras com produção moderada de biofilme.

Outro aspecto importante a ser avaliado no processo de formação do biofilme é a adesão inicial do micro-organismo na superfície, passo considerado essencial para a formação do biofilme. Infelizmente, a maioria dos estudos publicados avaliam a produção de biofilme apenas por experimentos de cristal violeta e/ou ágar vermelho Congo, sem avaliar a concentração ou adesão de células do biofilme. Para tanto, o presente trabalho representa um dos poucos estudos no Brasil que utiliza uma metodologia laboriosa no estudo do biofilme para avaliar estatisticamente a adesão bacteriana, a quantidade de células no biofilme e a formação de biofilmes em amostras clínicas de diferentes espécimes clínicos para *K. pneumoniae*.

Voltando na relação entre genes de resistência e virulência das amostras, de acordo com a literatura, é frequentemente relatado que as amostras resistentes aos antimicrobianos apresentam um maior custo fisiológico quando da aquisição de genes de resistência (GUO et al., 2012; MACHUCA et al., 2015). No entanto, não é totalmente compreendido se diferentes mecanismos de resistência e virulência estão associados ao maior ou menor custo do *fitness* em *K. pneumoniae*. Neste estudo, quando o *fitness* foi comparado entre as amostras resistentes e a multissensível, a ATCC apresentou maior aptidão biológica. O resultado mais intrigante foi na competição entre a amostra resistente aos carbapenêmicos (KPC 05) e a amostra resistente aos carbapenêmicos e à polimixina B (KPC 13), uma vez que KPC 13 mostrou maior capacidade adaptativa do que KPC 05. Esse resultado pode ser um indicativo de que vários outros genes podem estar envolvidos na maior ou menor aptidão da célula quanto ao *fitness*. A diminuição significativa do *fitness* nessas amostras pode levar a uma mudança na expressão de genes

bacterianos, com isso, outros estudos devem ser conduzidos na intenção de confirmar este achado.

Compreensivelmente, a prevalência de um genótipo depende da sua capacidade para sobreviver, ou seja, a sua aptidão. Trabalhos têm demonstrado que menores custos de *fitness* podem ocorrer pelo aparecimento de mutações compensatórias, que aliviam esse custo, não interferindo com o fenótipo de resistência (NILSSON et al., 2006; ZHANG et al., 2006). Por exemplo, amostras de *Salmonella typhimurium* acumularam rapidamente mutações compensatórias múltiplas que restauravam a virulência e a aptidão sem perda de resistência aos antimicrobianos (KOMP et al., 2005). A adaptação compensatória também foi estudada por Kugelberg et al. (2005) em amostras de *P. aeruginosa*, em que foi avaliado o efeito da resistência às quinolonas na aptidão bacteriana. Eles demonstraram que as mutações compensatórias tinham como objetivo restaurar o super-enrolamento do DNA para níveis normais. Finalmente, nossos resultados mostraram que em amostras multirresistentes com fenótipos altamente complexos, o estudo do *fitness* permite compreender melhor os mecanismos de adaptação da bactéria e sua contribuição na falha terapêutica.

A resistência a múltiplos antibióticos é um problema entre os micro-organismos da família Enterobacteriaceae, e os carbapenêmicos podem ser uma alternativa no tratamento de infecções causadas por essas bactérias. No entanto, a emergência e disseminação acelerada de β -lactamases com atividade hidrolítica aos carbapenêmicos, contribui significativamente para o aumento da multirresistência e conseqüentemente para as falhas terapêuticas associadas a infecções graves constituindo assim uma ameaça à saúde pública (GUPTA et al., 2003; PITOUT, 2010; CAO et al., 2014). A diversidade aliada aos dados epidemiológicos coletados das amostras de *K. pneumoniae* em nosso ambiente pode fornecer informações úteis para o controle da infecção. A diversidade clonal de *K. pneumoniae* e o fato da resistência aos carbapenêmicos poderem ser transmitidos horizontalmente, reforçam a importância de medidas de controle tais como a limpeza ambiental, a higiene das mãos e as políticas de controle de antibióticos, a fim de reduzir a propagação de *K. pneumoniae* e particularmente daqueles produtores de KPC.

6. CONCLUSÕES

Este estudo forneceu uma visão sobre a população de *K. pneumoniae* em amostras clínicas recuperadas do ambiente hospitalar. Observou-se uma diversidade de perfis clonais apesar de algumas amostras apresentarem 100% de similaridade. A alta prevalência de *K. pneumoniae* carregando *bla*_{CTX-M} sugere a disseminação de β -lactamases no hospital, o que não pode ser ignorada por já ser endêmica, além da emergência do gene *bla*_{KPC}. Adicionalmente, os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- Coletivamente, nossos resultados confirmam achados prévios em relação à capacidade de formação de biofilme em amostras clínicas de *K. pneumoniae*, independentemente do ano de isolamento, bem como do sítio. No entanto, no delineamento experimental realizado neste estudo, não encontramos relação entre o perfil clonal e a resistência a múltiplos fármacos e a capacidade das amostras de formar biofilme.
- Nossos resultados sugerem que a resistência à polimixina pode causar melhora substancial da aptidão da amostra e destaca que as amostras KPC-positivas e resistentes à polimixina podem apresentar uma vantagem para adaptação no ambiente hospitalar.
- Os dados obtidos evidenciam a importância da pressão seletiva de antibióticos, particularmente carbapenêmicos e polimixina, no favorecimento da disseminação e emergência de resistência de *K. pneumoniae*.
- Foi encontrada frequência elevada de genes de virulência tanto em amostras resistentes quanto sensíveis aos carbapenêmicos.
- A maioria das amostras de *K. pneumoniae bla*_{KPC-2} pertenceu ao CC258. Adicionalmente foi detectado o ST113, descrito até o momento no Brasil para *K. pneumoniae*, somente em amostras de aves.
- Nossos resultados mostraram taxas elevadas de mortalidade total e em 30 dias, bem como sua associação com a terapia inapropriada, apesar de não ter sido observado diferenças significativas na curva de sobrevivência, justificado provavelmente pelo número pequeno de amostras incluídas no estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, M. et al. Thermodynamic Prediction of Growth Temperature Dependence in the Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to Stainless Steel and Polycarbonate. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 7, p. 1116-1126, 2014.

ABDELRAOUF, K. et al. Effect of multidrug resistance-conferring mutations on the fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 1311-1317, 2011.

ALCÁNTAR-CURIEL, M. D. et al. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 129-138, 2013.

ANDRADE, L. N. et al. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3579-3583, 2011.

ANDRADE, L. N. et al. Expansion and Evolution of a Virulent, Extensively Drug-Resistant (Polymyxin B-Resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 International High-Risk Clone. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2530-2535, 2014.

ANDRADE, L. N. et al. International clones (ST11/340/252, ST15, ST101), epidemic plasmids (IncFIIk, IncR, IncL/M) and virulence factors associated with CTX-M(-15, -8, -2) and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. Abstract presented at the **25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Copenhagen**, Denmark 27 April Abstract no. P1523, 2015.

ARDUINO, S. M. et al. Transposons and integrons in colistin-resistant clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* with epidemic or sporadic behaviour. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 1417-1420, 2012.

AREND, L. N. et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in different facilities in Southern Brazil. **American Journal of Infection Control**, v. 43, n. 2, p 137-140, 2015.

ARMENTANO, I. et al. The Interaction of Bacteria with Engineered Nanostructured Polymeric Materials: A Review. **ScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 410423, 2014.

AHMED, A. et al. Current concepts in combination antibiotic therapy for critically ill patients. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 18, n. 5, p. 310-314, 2014.

AZEVEDO, F. M. Micro-organismos multirresistentes. In: OLIVEIRA, A. C. **Infecções hospitalares: epidemiologia, prevenção e controle**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

BAQUERO, F.; COQUE, T. M.; CRUZ, F. L. Ecology and Evolution as Targets: the Need for Novel Eco-Evo Drugs and Strategies To Fight Antibiotic Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 8, p. 3649-3660, 2011.

BARATI, A. et al. Isolation and Characterization of Aquatic-Borne *Klebsiella pneumoniae* from Tropical Estuaries in Malaysia. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 426, p. 1-16, 2016.

BASSETTI, M; RIGHI, E. Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? **Hematology American Society of Hematology Education Program**, p. 428-432, 2013.

BATISTÃO, D. W. F. et al. Biofilm formation of Brazilian meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: prevalence of biofilm determinants and clonal profiles. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, p. 286-297, 2016.

BECEIRO, A. et al. Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 518-526, 2014.

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

BEN-DAVID, D. et al. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 1, p. 54-60, 2012.

BISWAS, S. et al. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 8, p. 917-934, 2012.

BOCANEGRA-IBARIAS, P. et al. Genetic characterisation of drug resistance and clonal dynamics of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting in Mexico. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, p. 309-313, 2015.

BOGDANOVICH, T. et al. Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 4, p. 373-376, 2011.

BONNET, R., et al. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1936-1942, 2000.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum β -lactamase: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2004.

BONURA, C. et al. An Update of the Evolving Epidemic of *bla*_{KPC} Carrying *Klebsiella pneumoniae* in Sicily, Italy, 2014: Emergence of Multiple Non-ST258 Clones. **Plos One**, p. 1-9, 2015.

BRISSE, S.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. The Genus *Klebsiella*. **The Prokaryotes**, v. 3, p. 159-196, 2006.

BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A. H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. **FEMS Microbiology Letters**, v. 46, n. 2, p. 165-173, 1987.

BUSH, K.; JACOBY, G.; MEDEIROS, A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.

BUSH, K.; JACOBY, G. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-76, 2010.

BUSH, K. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1277, p. 84-90, 2013.

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

CANTÓN, R., COQUE, T. M. The CTX-M β -lactamase pandemic. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 466-475, 2006.

CAO, X. et al. Molecular characterization of clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 16, 2014.

CASTANHEIRA, M. et al. Expansion of clonal complex 258 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin American Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 1668–1669, 2012.

CASTANHEIRA, M. et al. Changes in the Frequencies of β -Lactamase Genes among Enterobacteriaceae Isolates in U.S. Hospitals, 2012 to 2014: Activity of Ceftazidime-Avibactam Tested against β -Lactamase-Producing Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 4770-4777, 2016.

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

CERDEIRA, L. et al. Draft Genome Sequence of a Hospital-Associated Clone of *Klebsiella pneumoniae* ST340/CC258 Coproducing RmtG and KPC-2 Isolated from a Pediatric Patient. **Genome Announcements**, v. 4, n. 6, p. e01130-16, 2016.

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

CHEN, S. et al. High prevalence of KPC-2-type carbapenemase coupled with CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 2493–2494, 2011.

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

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

COLOMB-COTINAT, M. et al. Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB), France, 2012. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 5, p. 56, 2016.

CURRAN, B. et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5644-5649, 2004.

CURTIS, C.; MARRIOTT, J.; LANGLEY, C. Development of a prescribing indicator for objective quantification of antibiotic usage in secondary care. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 529-533, 2004.

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

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

DIANCOURT, L. et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4178-82, 2005.

DIDIODATO, G. et al. Evaluating the impact of an antimicrobial stewardship program on the length of stay of immune-competent adult patients admitted to a hospital ward with a diagnosis of community-acquired pneumonia: A pragmatic clinical trial. In: **IDWeek 2015**. Idsa, 2015.

DONATI, V. et al. Extended-Spectrum-Beta-Lactamases, AmpC Beta-Lactamases and Plasmid Mediated Quinolone Resistance in *Klebsiella* spp. from Companion Animals in Italy. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. e90564, 2014.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 277-281, 2001.

DUMARTIN, C. et al. Antibiotic use in 530 French hospitals: results from a surveillance network at hospital and ward levels in 2007. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 2028-2036, 2010.

DYAR, O. J.; PAGANI, L.; PULCINI, C. Strategies and challenges of antimicrobial stewardship in long-term care facilities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 1, p. 10-19, 2015.

ECDC, EUROPEAN CENTER FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. **Annual report of the European antimicrobial resistance surveillance network (EARS-Net)**. Stockholm: ECDC; 2014. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx>. Acesso em 25 de fevereiro de 2017.

EUCAST, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.0**. Disponível em: <http://www.eucast.org>. Acesso em 25 de fevereiro de 2017.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 25-64, 2014.

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

FANG, C. T. et al. *Klebsiella pneumoniae* Genotype K1: An Emerging Pathogen That Causes Septic Ocular or Central Nervous System Complications from **Pyogenic Liver Abscess**. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 284-293, 2007.

FERREIRA, M. L. et al. Molecular epidemiological survey of the quinolone- and carbapenem-resistant genotype and its association with the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 262-271, 2015.

FERREIRA, J. C. et al. Evaluation and characterization of plasmids carrying CTX-M genes in a non-clonal population of multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from poultry in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 85, n. 4, p. 444-448, 2016.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, 2010.

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

FOUCAULT, M.; COURVALIN, P.; GRILLOT-COURVALIN, C. Fitness cost of VanA-type vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2354-9, 2009.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008e2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 3540360, 2012.

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

GERACI, D. M. et al. Is the monoclonal spread of the ST258, KPC-3-producing clone being replaced in southern Italy by the dissemination of multiple clones of carbapenem-nonsusceptible, KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae*? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 3, p. 15-17, 2015.

GIANI, T. et al. Large nosocomial outbreak of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* traced to clonal expansion of an mgrB deletion mutant. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, p. 3341-3344, 2015.

GILBERT, D. N. et al. **The Sanford guide to antimicrobial therapy 2007**. Sperryville, VA: Antimicrobial Therapy Incorporated, 37th ed., 2007.

GIRARD, L. P. et al. MIC versus MBEC to determine the antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* in peritoneal dialysis peritonitis. **Peritoneal Dialysis International**, v. 30, n. 6, p. 652-656, 2010.

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

GOOTZ, T. D. et al. Genetic organization of transposase regions surrounding *bla_{KPC}* carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 1998-2004, 2009.

GÜLMEZ, D. et al. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 6, p. 523-6, 2008.

GUO, B. et al. Predicting bacterial fitness cost associated with drug resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 928-32, 2012.

GUPTA, A. et al. Extended Spectrum beta Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* Infections: a Review of the Literature. **Journal of Perinatology**, v. 23, p. 439-443, 2003.

HAMBRAEUS, A. Lowbury lecture 2005: infection control from a global perspective. **Journal of Hospital Infection**, v. 64, n. 3, p. 217-223, 2006.

HARBARTH, S. Epidemiology and prognostic determinants of bloodstream infections in surgical intensive care. **Archives of Surgery**, v. 137, n. 12, p. 1353-1359, 2002.

HAWKEY, P. M. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a product of globalization. **Journal of Hospital Infection**, v. 89, p. 241-247, 2015.

HAYAKAWA, K. et al. Growing prevalence of *Providencia stuartii* associated with the increased usage of colistin at a tertiary health care center. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, p. e646-e648, 2012.

HENGZHUANG, W. et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4469-4474, 2011.

HOIBY, N. et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, p. S1-25, 2015.

JACKSON, R.W. et al. The influence of the accessory genome on bacterial pathogen evolution. **Mobile Genetic Elements**, v.1, n.1, p.55-65, 2011.

JACOBY, G. A.; MUNOZ-PRICE, L. S. The New β -lactamases. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 380-391, 2005.

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

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

JONES, R. N. et al. Susceptibility rates in Latin American nations: report from aregional resistance surveillance program (2011). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. 672–681, 2013.

KARAM, G. et al. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. **Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 136, 2016.

KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. **European Cells & Materials**, v. 8, p. 37-57, 2004.

KIM, S. Y. et al. Characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates from Korea. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 4, p. 486-490, 2013.

KUGELBERG, E. et al. Reduction of the fitness burden of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 22-30, 2005.

KWA, A. L. et al. The impact of multidrug resistance on the outcomes of critically ill patients with Gram-negative bacterial pneumonia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 59, n. 1, p. 99-104, 2007.

- KWON, A. S. et al. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 1, p. 68-72, 2008.
- LAHEY CLINIC. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA **Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes**. Disponível em: <http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>. Acesso em 26 de fevereiro de 2017.
- LAPPIN-SCOTT, H. M.; BASS, C. Biofilm formation: attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces. **American Journal of Infection Control**, v. 29, n. 4, 2001.
- LASCOLS, C. et al. Surveillance and Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Isolates That Produce Carbapenemases: First Report of OXA-48-Like Enzymes in North America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 130-136, 2013.
- LAVERTY, G.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. **Future Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 509-24, 2013.
- LECHEVALLIER, M. W.; CAWTHON, C. D.; LEE, R. G. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 649-654, 1988.
- LEE, H. W. et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 49-54, 2008.
- LI et al., 2012. Epidemic of *Klebsiella pneumoniae* ST11 Clone Coproducing KPC-2 and 16S rRNA Methylase RmtB in a Chinese University Hospital. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, p. 373, 2012.
- LING, M. L. et al. Risk factors for acquisition of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in an acute tertiary care hospital in Singapore. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 4, p. 26, 2015.
- LIVERMORE, D. M. Multiple mechanism of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infection Diseases**, v. 34, n. 5, p. 634-640, 2002.

- LIVERMORE, D. M.; HAWKEY, P. M. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 451-454, 2005.
- LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 413-420, 2006.
- LIVERMORE, D. M. Fourteen years in resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, p. 283-294, 2012.
- LODISE, T.P. et al. Predictors of 30-day mortality among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: impact of delayed appropriate antibiotic selection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3510-3515, 2007.
- MACHUCA, J. et al. Effect of efflux pump QepA2 combined with chromosomally mediated mechanisms on quinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 9, p. 2524-2527, 2015.
- MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.
- MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-9, 2001.
- MAMMINA, C. et al. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. **Euro Surveillance**, v. 17, p. 1-4, 2012.
- MANDELL, G.L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 6a ed. Elsevier Churchill Livingstone, 2005.
- MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 413-451, 2007.
- MOROSINI, M. I. et al. Antibiotic Coresistance in Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and In Vitro Activity of Tigecycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2695–2699, 2006.

- MARKOVSKA, R. et al. Clonal dissemination of multilocus sequence type ST15 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. **APMIS**, v. 123, n. 10, p. 887-894, 2015.
- MARTÍNEZ, J. L.; BAQUERO, F.; ANDERSSON, D. I. Predicting antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 958-65, 2007.
- MARTINS, W. M. et al. Coproduction of KPC-2 and QnrB19 in *Klebsiella pneumoniae* ST340 isolate in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 83, n. 4, p. 375-376, 2015.
- MATHERS, A. J. et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing *K. pneumoniae* at a Single Institution: Insights into Endemicity from Whole-Genome Sequencing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, n.3, p.1656-1663, 2015.
- MENDES, C. et al. Antimicrobial susceptibility in intensive care units: MYSTIC Program Brazil 2002. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 44-51, 2005.
- MERKIER, A. K. et al. Outbreak of a cluster with epidemic behavior due to *Serratia marcescens* after colistin administration in a hospital setting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 2295-2302, 2013.
- MERRITT, J. H.; KADOURI, D. E. e O'TOOLE, G. A. **Growing and analyzing static biofilms**. Current Protocols in Microbiology, v. Chapter 1, n. August, p. Unit 1B.1, 2005.
- MEYER, E. et al. Design of a Surveillance System of Antibiotic Use and Bacterial Resistance in German Intensive Care Units (SARI). **Infection**, v. 47, n. 4, p. 208-215, 2003.
- MOFFATT, J. H. et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 4971-4977, 2010.
- MONNET, D. L. Defined daily doses of antimicrobials reflect antimicrobial prescriptions in ambulatory care. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 1109-1111, 2004.
- MONSTEIN, H. J. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in Enterobacteriaceae. **APMIS**, v. 115, p. 1400-1408, 2007.

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

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

MUNOZ-PRICE, L. S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 785–796, 2013.

NAPARSTEK, L. et al. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 1027-1034, 2014.

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

NILSSON, A. I. et al. Reducing the fitness cost of antibiotic resistance by amplification of initiator tRNA genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 103, n. 18, p. 6976– 6981, 2006.

NNIS, NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. **American Journal of Infection Control**, v. 32, p. 470-485, 2004.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 9, p. 821-830, 2014.

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

OKAMOTO, K. et al. Risk Factors for Acquisition of Rectal Colonization With KPC-Producing Enterobacteriaceae (KPC) Among Long-Term Acute Care Hospital (LTACH) Patients. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 1, 2015.

OLIVEIRA, K. **β -lactamases na família enterobacteriaceae: métodos de detecção e prevalência [dissertação]**. Rio Grande do Sul: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 89 p.

OLIVEIRA, S. et al. 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.

O'NEILL, A. J. et al. Molecular genetic and structural modeling studies of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase and the fitness of rifampin resistance genotypes in relation to clinical prevalence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 298-309, 2006.

ONG, D. S. Y. Antibiotic exposure and resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* species in intensive care units. **Critical Care Medicine**, v. 39, n. 11, p. 2458-2463, 2011.

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

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

_____. Community-associated MRSA: what makes them special? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6-7, p. 324-30, 2013a.

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

PAPP-WALLACE, K. M. et al. Carbapenems: Past, Present, and Future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4943-4960, 2011.

PARAMYTHIOTOU, E.; ROUTSI, C. Association between infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria and mortality in critically ill patients. **World Journal of Critical Care Medicine**, v. 5, n. 2, p. 111-120, 2016.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.

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

PEIRANO, G. et al. The characteristics of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Canada. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, n. 2, p. 106-109, 2011.

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

PEREIRA, P. S. et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.68, p. 312-316, 2013.

PICÃO, R. C. et al. Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 2225-2226, 2009.

PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 6, p. 371-9, 2010.

PITOUT, J. D. Infections with Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. **Drugs**, v. 70, p. 313-333, 2010.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, 1998.

POIREL, L; BONNIN, R. A.; NORDMANN, P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 5, p. 883-893, 2012.

PORTO, J. P. et al. Active surveillance to determine the impact of methicillin resistance on mortality in patients with bacteremia and influences of the use of antibiotics on the development

of MRSA infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p.713-718, 2013.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 440-458, 2007.

QUINTEROS, M. et al. Extended-Spectrum β -Lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 9, p. 2864-2867, 2003.

RAJAMOHAN, G.; SRINIVASAN, V. B.; GEBREYES, W. A. Biocide-tolerant multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains are associated with higher biofilm formation. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, n. 3, p. 287-289, 2009.

ROLAIN, J. M. et al. *Acinetobacter Baumannii* Resistant to Colistin With Impaired Virulence: A Case Report From France. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 7, p. 1146-1147, 2011.

ROYER, S. et al. Spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clones in patients with ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit at a university hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, 2015.

RUIZ-GARBAJOSA, P. et al. Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 11, p. 2487-2492, 2013.

SADER, H. S. et al. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 25-79, 2004.

SAMONIS, G. et al. Trends of isolation of intrinsically resistant to colistin Enterobacteriaceae and association with colistin use in a tertiary hospital. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 9, p. 1505-1510, 2014.

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

SANCHEZ, C. J. et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47, 2013.

SÁNCHEZ-ROMERO, I. et al. Nosocomial outbreak of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates of multilocus sequence type 15: molecular basis, clinical risk factors, and outcome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 420-427, 2012.

SAVAGE, R. D. et al. The Effect of Inadequate Initial Empiric Antimicrobial Treatment on Mortality in Critically Ill Patients with Bloodstream Infections: A Multi-Centre Retrospective Cohort Study. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0154944, 2016.

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

SCHWABER, M. J. et al. High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 2137-2139, 2005.

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

SHOMA, S. et al. Characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Australia carrying *bla*_{NDM-1}. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 1, p. 93-97, 2014.

SNITKIN, E. S. et al. Tracking a Hospital Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Whole-Genome Sequencing. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 148, p. 48-116, 2012.

SOUSA, C. ***Staphylococcus epidermidis* adhesion and biofilm formation onto biomaterials [tese]**. Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 2009. 225 f.

SOUVEREIN, D. et al. Polyclonal Spread and Outbreaks with ESBL Positive Gentamicin Resistant *Klebsiella* spp. in the Region Kennemerland, The Netherlands. **Plos One**, v. 9, n. 6, p. e101212, 2014.

SRINIVASAN, A.; PATEL, J. B. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing organisms: an ounce of prevention really is worth a pound of cure. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 12, p. 1107-9, 2008.

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

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

SUN, P. et al. Occurrence of *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M} and *mcr-1* in Enterobacteriaceae from Well Water in rural China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 2, 2017.

TACCONELLI, E. et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrugresistant gram-negative bacteria in hospitalized patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. S1-S55, 2014.

THOMSON, K. S. Extended-Spectrum- β -Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1019-1025, 2010.

TUMBARELLO, M. et al. Bloodstream infections caused by extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: risk factors, molecular epidemiology, and clinical outcome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 498-504, 2006.

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

VITRAT, V. et al. Optimizing antimicrobial therapy in critically ill patients. **Infection and Drug Resistance**, v. 7, p. 261-271, 2014.

VOULGARI, E. et al. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 84-88, 2013.

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

YAMAMOTO, M.; POP-VICAS, A. Treatment for infections with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: what options do we still have? **Critical Care**, v. 18, p. 229, 2014.

YAN, J. J. et al. Extended-Spectrum β -Lactamases and Plasmid-Mediated AmpC Enzymes among Clinical Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Seven Medical Centers in Taiwan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 1861-1864, 2006.

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. 369-371, 2008.

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

ZHANG, Q. et al. Fitness of antimicrobial-resistant *Campylobacter* and *Salmonella*. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 7, p. 1972-1978, 2006.

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131, e-mail: ;

**ANÁLISE FINAL Nº. 071/10 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO
 CEP/UFU 224/09**

Projeto Pesquisa: Infecções hospitalares por enterobacteriase resistentes aos carbapenêmicos no hospital de clínicas da Universidade Federal de Uberlândia: Fatores de risco, impacto clínico e econômico.

Pesquisador Responsável: Paulo Gontijo Filho

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.
 O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega do relatório final: dezembro de 2011.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 08 de março de 10.

Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
 Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador

• O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

ANEXO II

Saúde
Ministério da Saúde

Plataforma Brasil

Público Pesquisador Alterar Meus Dados

Paulo Pinto Gontijo Filho - Pesquisador

Sua sessão expira

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

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

COORDENADOR

Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_490

DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 2

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

Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações
-------------------	----------	---------	----------	-------

LISTA DE APRECIÇÕES DO PROJETO

Apreciação	Pesquisador Responsável	Versão	Submissão	Modificação	Situação	Exclusiva do Centro Coord.	Ações
PO	Paulo Pinto Gontijo Filho	2	13/07/2015	03/09/2015	Aprovado	Não	   

HISTÓRICO DE TRÂMITES

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

Ocorrência 1 a 10 de 20 registro(s)

