



Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

CATARINA FERNANDES DE FREITAS

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS, GENE DE RESISTÊNCIA
BLA_{KPC} E GENES DE VIRULÊNCIA NA FORMAÇÃO DO BIOFILME POR
ISOLADOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

Recife
2019

CATARINA FERNANDES DE FREITAS

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS, GENE DE RESISTÊNCIA
BLA_{KPC} E GENES DE VIRULÊNCIA NA FORMAÇÃO DO BIOFILME POR
ISOLADOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

Tese de Doutorado apresentada à banca avaliadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical

Orientador: Prof^o. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Dyana Leal Veras

Recife
2019

F866e	Freitas, Catarina Fernandes de. Efeito da associação de antimicrobianos, gene de resistência <i>bla_{KPC}</i> e genes de virulência na formação do biofilme por isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> / Catarina Fernandes de Freitas. – 2019. 131 f.: il.; tab.; 30 cm. Orientador: Fábio André Brayner dos Santos. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2019. Inclui referências e apêndices. 1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>. 2. Biofilme. 3. Sinergismo. 4. <i>Bla_{KPC}</i>. 5. Genes de virulência. I. Santos, Fábio André Brayner dos (Orientador). II. Título.
616.988	CDD (20.ed.) UFPE (CCS2019-171)

CATARINA FERNANDES DE FREITAS

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS, GENE DE RESISTÊNCIA
BLA_{KPC} E GENES DE VIRULÊNCIA NA FORMAÇÃO DO BIOFILME POR
ISOLADOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

Tese apresentada a Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical.

Aprovada em: 15 de março de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Ana Paula Sampaio Feitosa (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Fernanda Carolina Bezerra Dias (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Thiago José Matos Rocha (Examinador Externo)
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas

Dedico este trabalho à minha mãe, Penha Fernandes, razão do meu viver.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, agradeço pelos obstáculos que colocaste em meu caminho, sei que tens um propósito para tudo. Muito obrigada por me guiar em todas as escolhas e por me dar forças para seguir em frente, obrigada paizinho pelo teu amor, pela tua proteção, por me capacitar, por me ensinar a caminhar pela fé e me sustentar até aqui; pelo dom da vida, por me dar sempre a Tua mão como um Pai amoroso que jamais abandona seus filhos;

Aos orientadores Prof^o. Dr. Fábio Brayner e Prof^o. Dr. Luiz Alves, por todo apoio, confiança, compreensão, ensinamentos, por tantos bons momentos compartilhados e sobretudo pela paciência e esforço dos últimos dias;

À Prof^a. Dr^a Dyana Veras pela co-orientação, esforço, paciência, preocupação, compreensão, cuidado, dedicação e muitas experiências compartilhadas;

Aos professores que compõem o programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical por compartilharem o conhecimento e contribuírem positivamente para meu aprendizado e minha formação;

À coordenadora do programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Prof^a. Dr^a. Maria Amélia Vieira Maciel e à vice-coordenadora do programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Prof^a. Dr^a. Valdênia Maria Oliveira de Souza, pela dedicação e apoio de sempre;

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de pós-graduação, possibilitando assim a dedicação exclusiva para a realização deste trabalho;

À minha mãezinha Penha Fernandes, pelo amor incondicional, companhia, compreensão, cuidado, dedicação, apoio, atenção e por ser exemplo de profissional e principalmente me ensinar que lutar sempre é o melhor caminho, independente dos obstáculos;

Ao meu pai, Célio Freitas (*in memoriam*), pelo amor e incentivo aos estudos, sei que estaria feliz e orgulhoso;

Aos meus irmãos queridos, Mila e Tom, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em tudo, pelo amor, cuidado e carinho que sempre tiveram comigo;

Aos meus sobrinhos, Teté e Enzo, por toda alegria que me proporcionam, são os amores da minha vida;

Aos meus cunhados Anselmo e Lorena, pelo amor, ajuda e apoio de sempre;

Aos meus tios Warlindo Carneiro e Fátima Menezes, por serem exemplos de professores e me incentivarem incondicionalmente nessa árdua jornada, a ajuda concedida foi essencial para que eu pudesse chegar até aqui, serei eternamente grata;

À minha querida prima-irmã, Tita, pelo exemplo de estudante, pela ajuda, apoio e cuidado nos momentos mais difíceis;

À prima Tata pelo amor e cuidado, pela sua generosidade e incentivo nos estudos, viagens e congressos;

À toda minha família, sobrinhos, primos e tios pela ajuda concedida e compreensão da minha ausência;

Aos amigos Gilma, Alex, Raíssa (*in memorian*), Flavinha, Rebeca, Nara, Alê, Denise, Geison, Ana Cristina, Mari, Wanessa, Cândida, Adriana, Erla, Valéria, Cely, Eliana, Rafa, Karyna, Mirella, Camila obrigada pelas palavras de apoio, risadas, aprendizados compartilhados, orações, carinho, amor e torcida;

Aos alunos e colaboradores que fizeram e fazem parte do LBCM e ME-LIKA: Fernanda, Everton, Jorge, Daivy, Thaynara, Flávia, Mariana, Camila, Janderson, Alberon, Gabriel, Nairom, Amanda, Rubens, Elverson, Sofia, Anderson, Walter, Vitor, Nil, Leonardo, Ana Paula, Amanda Aliança, Duda, Carmel, Cida, Dani, Cícero, Paulinha, Alana, Olavo, Wellington ao longo desses anos foram muitos momentos científicos e de descontração, serei eternamente grata por toda ajuda e apoio prestados;

Ao *team* bactéria do LBCM, em especial à amiga Fernanda Lima e Jorge Belém, foram muitas lutas e vocês sempre me apoiaram, a querida Daivy pelo carinho dessa menina pequena, mas tão grande e ao querido Everton, mesmo longe, sempre torcendo e disposto a ajudar;

À querida amiga Grasielle Vaz pela amizade, cuidado, força e apoio nos momentos mais tensos dessa caminhada, não medindo esforços para que eu concluísse com êxito;

À querida amiga Fernanda Lima por sua amizade, foram muitos anos juntas na bancada, sou muito grata pelo seu apoio, pelas incontáveis ajudas e ricas contribuições para realização deste trabalho;

Às amigas Carmel e Paulinha pelas muitas ajudas nos experimentos com biologia molecular, pela dedicação, apoio e carinho, exemplos de profissionais que levarei comigo;

À Thaynara, Flávia e Mariana pela grande ajuda nos experimentos finais;

À amiga Camila Queiroz, presente de Deus, muito obrigada pelo seu ombro e ouvido amigos, pelas críticas e conselhos, momentos de diversão, a amiga mais sincera que poderia ter;

Ao doutorando Cícero Pinheiro (Micologia-UFPE), chegou no finalzinho dessa caminhada, mas muito me ensinou, foram muitas horas de bancada compartilhadas, obrigada

pela sua compreensão e suporte nas horas extenuantes de trabalho, pela ajuda sempre presente nas muitas repetições, pelo compartilhamento de protocolos, idéias e muito trabalho...você é um exemplo de persistência;

Ao apoio, ajuda e esclarecimentos técnico-científicos prestados por Luís Cláudio, Carolina, Igor, Renata, Thaynan, Elza, Alexsandra, Érica e Beth;

Às professoras Amélia Maciel e Ana Catarina Lopes, por me apresentarem a microbiologia e despertar em mim o interesse em estudar as bactérias, obrigada pela atenção e disponibilidade em ensinar e ajudar sempre;

À professora Ana Beatriz Sotero pela dedicação, pelo conhecimento e experiências compartilhadas, por acreditar no meu potencial e contribuir para minha formação;

À professora Betânia Oliveira e sua aluna Livia Caroline pela paciência, disponibilidade e suporte oferecidos;

Ao professor Reginaldo Gonçalves pelos ensinamentos e sua disponibilidade em ajudar;

À Júlia e Amanda (CETENE) pela ajuda, apoio e trabalho na execução de técnicas;

Aos técnicos do setor de Microscopia Eletrônica do LIKA/UFPE, Rafael e Jana pelo apoio, incentivo e paciência;

Aos funcionários do NPT/IAM, Cássia, Viviane, e Karina pela dedicação e auxílio na execução de técnicas essenciais para este estudo;

À Dona Yara Nakazawa (Microbiologia/IAM) pelos ensinamentos, pela disponibilidade, pelas palavras de apoio e precioso suporte técnico;

Aos que fazem parte do LAVITE, da Microbiologia e da Imunologia do IAM/FIOCRUZ-PE, grata pelos conhecimentos compartilhados e pela receptividade;

Aos responsáveis pela esterilização e descontaminação, Felipe (LIKA/UFPE), Sr Airton (LIKA/UFPE); Sr. Nelson, Rita e Edson (IAM/FIOCRUZ-PE) pelo apoio e serviços prestados;

Aos técnicos administrativos Valter, Neemias e demais funcionários do Departamento de Medicina Tropical da UFPE,

À Cristiane, Josué, Sr Marcos e demais funcionários do Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE), pela presteza e atenção;

Aos que me ajudaram direta ou indiretamente para conclusão deste trabalho.

“Até que seu desejo de seguir em frente seja maior que as memórias passadas você jamais participará do poder de criar novamente” (JAKES, 2012).

RESUMO

O tratamento de infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* representa um problema mundial para o tratamento de infecções adquiridas em ambiente hospitalar, devido a presença de mecanismos de resistência e virulência. Dessa forma, a associação de antimicrobianos tem sido utilizada como alternativa terapêutica. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença do gene de resistência *bla*_{KPC} e genes de virulência e a capacidade de isolados clínicos de *K. pneumoniae* formarem biofilme, avaliar o efeito sinérgico da associação de antimicrobianos, verificar a expressão do gene de resistência *bla*_{KPC} e de genes relacionados à formação de biofilme, bem como pesquisar alterações morfológicas na formação de biofilme por isolados produtores de KPC submetidos à ação de antimicrobianos isoladamente e em associação. Foram utilizados 40 isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de dois hospitais públicos de Recife-PE. A confirmação da espécie e o perfil clonal dos isolados foi realizado através da técnica de MALDI-TOF e de ERIC-PCR, respectivamente. Para a detecção do gene de resistência *bla*_{KPC} e dos genes de virulência *cps*, *fimH*, *mrkD*, *mrkA*, *ecpA* e *luxS* foi realizada a técnica de PCR. A capacidade da formação de biofilme pelos isolados foi determinada pela técnica de cristal violeta. O sinergismo foi avaliado frente dez isolados selecionados pelo ensaio de *Checkerboard*. A ação de sub-CIMs de amicacina, polimixina B e meropenem, e a associação destes antimicrobianos na formação de biofilme pelos isolados de *K. pneumoniae* foi avaliada através das técnicas de cristal violeta e de microscopia eletrônica de varredura. A expressão dos genes *bla*_{KPC}, *fimH*, *mrkD*, *ecpA* e *luxS* foi avaliada pela técnica de RT-PCR. Todos os isolados pertenciam a espécie *K. pneumoniae*. Foi observado uma heterogeneidade genética entre os isolados de *K. pneumoniae*, entretanto foram detectados três grupos com similaridade acima de 96%, sendo dois no mesmo hospital e um deles em hospitais distintos, indicando uma disseminação inter-hospitalar. Foi verificado que dentre os isolados analisados 45% (18/40) foram portadores do gene *bla*_{KPC-2}, estes isolados apresentaram maior frequência dos genes de virulência indicando uma forte relação com a formação de biofilme. Dos 40 isolados, 38 formaram biofilme, sendo a maioria classificados como fortes formadores. Ambas associações de antimicrobianos apresentaram um efeito sinérgico ou aditivo frente dez isolados portadores do gene *bla*_{KPC-2} analisados. As concentrações sub-CIMs dos antimicrobianos sozinhos e em combinação interferiram na expressão dos genes *fimH* e *mrkD*, além de causar diferentes alterações morfológicas nos biofilmes formados, como variação na quantidade de células aderidas e de matriz extracelular produzida, além da presença de células alongadas ou arredondadas, indicando injúria celular. Estes resultados demonstram uma relação entre a

presença dos genes de virulência pesquisados e a formação de biofilme, que sob a ação de concentrações sub-CIMs dos antimicrobianos e associações podem alterar a expressão dos genes estudados e causar modificações morfológicas no biofilme produzido pelos isolados de *K. pneumoniae*.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*. Biofilme. Sinergismo. *bla*_{KPC}. Genes de virulência.

ABSTRACT

The treatment of infections caused by *Klebsiella pneumoniae* represents a worldwide problem for the treatment of infections acquired in a hospital environment, due to the presence of mechanisms of resistance and virulence. Thus, the association of antimicrobials has been used as a therapeutic alternative. The objective of this work was to investigate the presence of the *bla*_{KPC} resistance gene and virulence genes and the ability of clinical isolates of *K. pneumoniae* to biofilm, to evaluate the synergistic effect of the association of antimicrobials, to verify the expression of the *bla*_{KPC} resistance gene and genes related to the formation of biofilms, as well as to investigate morphological changes in the formation of biofilms by isolates of KPC submitted to antimicrobial action alone and in association. We used 40 clinical isolates of *K. pneumoniae* from two public hospitals in Recife-PE. Confirmation of the species and the clonal profile of the isolates were performed using the MALDI-TOF and ERIC-PCR techniques, respectively. For the detection of the *bla*_{KPC} resistance gene and the virulence genes *cps*, *fimH*, *mrkD*, *mrkA*, *ecpA* and *luxS* the PCR technique was performed. The ability of biofilm formation by isolates was determined by the crystal violet technique. The synergism was evaluated against ten isolates selected by the Checkerboard assay. The action of sub-CIMs of amikacin, polymyxin B and meropenem and the association of these antimicrobials in biofilm formation by *K. pneumoniae* isolates was evaluated using violet crystal and scanning electron microscopy techniques. Expression of the *bla*_{KPC}, *fimH*, *mrkD*, *ecpA* and *luxS* genes was evaluated by the RT-PCR technique. All isolates belonged to the species *K. pneumoniae*. Genetic heterogeneity was observed among the isolates of *K. pneumoniae*, however, three groups with similarity above 96% were detected, two in the same hospital and one in different hospitals, indicating an interhospital spread. It was verified that 45% (18/40) of the analyzed isolates were carriers of the *bla*_{KPC-2} gene, these isolates showed a higher frequency of the virulence genes indicating a strong relation with biofilm formation. Of the 40 isolates, 38 formed a biofilm, the majority being classified as strong formers. Both associations of antimicrobials had a synergistic or additive effect against ten isolates carrying the analyzed *bla*_{KPC-2} gene. The sub-MICs concentrations of the antimicrobials alone and in combination interfered in the expression of *fimH* and *mrkD* genes, as well as causing different morphological changes in the formed biofilms, such as variation in the number of adhered cells and extracellular matrix produced, in addition to the presence of elongated or rounded, indicating cellular injury. These results demonstrate a relationship between the presence of virulence genes and biofilm formation, which under the action of sub-MICs concentrations of the

antimicrobials and associations may alter the expression of the genes studied and cause morphological changes in the biofilm produced by the isolates of *K pneumoniae*.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*. Biofilm. Synergism. *bla*_{KPC}. Genes of virulence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TESE

Figura 1 – Esquema das etapas de formação do biofilme	33
---	----

ARTIGO 1

Figura 1 – Dendograma da similaridade genética dos 40 isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> gerado pelo software PAST.....	61
---	----

ARTIGO 2

Figura 1 – Efeitos dos antimicrobianos amicacina, polimixina B e meropenem sozinhos e associados na formação de biofilme pelo isolado K07 de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	85
Figura 2 – Efeitos dos antimicrobianos amicacina, polimixina B e meropenem sozinhos e associados na formação de biofilme pelo isolado K94 de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	86
Figura 3 – Efeitos dos antimicrobianos amicacina, polimixina B e meropenem sozinhos e associados na formação de biofilme pelo isolado K870 de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	87
Figura 4 – Eletromicrografias isolado K07 de <i>Klebsiella pneumoniae</i> tratados com antimicrobianos durante a formação do biofilme.....	90
Figura 5 – Eletromicrografias isolado K94 de <i>Klebsiella pneumoniae</i> tratados com antimicrobianos durante a formação do biofilme.....	91
Figura 6 – Eletromicrografias isolado K870 de <i>Klebsiella pneumoniae</i> tratados com antimicrobianos durante a formação do biofilme.....	92

LISTA DE TABELAS

TESE

Tabela 1 – <i>Primers</i> utilizados para detecção de genes.....	49
Tabela 2 – Sequência de <i>primers</i> utilizados nas reações de RT-PCR para detecção dos genes <i>bla_{KPC}</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i> , <i>luxS</i> , <i>ecpA</i> nos isolados de <i>K. pneumoniae</i> estudados.....	54

ARTIGO 1

Tabela 1 – <i>Primers</i> utilizados para PCR e ERIC-PCR.....	59
Tabela 2 – Caracterização dos Isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> portadores do gene <i>bla_{KPC}</i>	63
Tabela 3 - Caracterização dos Isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> não portadores do gene <i>bla_{KPC}</i>	64

ARTIGO 2

Tabela 1 – Sequência de <i>primers</i> utilizados nas reações de RT-PCR para detecção dos genes <i>bla_{KPC}</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i> , <i>luxS</i> , <i>ecpA</i> nos isolados de <i>K. pneumoniae</i> estudados.....	80
Tabela 2 – Classificação dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> quanto a capacidade de formação de biofilme pelo método fenotípico em microplaca.....	81
Tabela 3 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> frente ao meropenem, amicacina e polimixina B	82
Tabela 4 – Efeito sinérgico do meropenem com amicacina e do meropenem com a polimixina B frente isolados de <i>K. pneumoniae</i>	83
Tabela 5 – Expressão dos genes <i>bla_{KPC}</i> , <i>ecpA</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i> , <i>luxS</i> no biofilme formado na ausência e presença dos antimicrobianos amicacina (AMK), meropenem (MERO), polimixina B (POL) e das associações de amicacina e meropenem (AMK+MERO) e de polimixina B e meropenem (POL+MERO)	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Medida da intensidade de corrente elétrica
AmpC	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> - Infusão de Cérebro e Coração
CCS	Centro de Ciências da Saúde
cDNA	Ácido desoxirribonucleicocomplementar
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CHCA	<i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>
CHEF-TE	Solução tampão de EDTA/TRIS
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CTX-M	Cefotaximase, primeiramente isolada em Munich
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
ESBL	<i>Extended Spectrum β-Lactamase</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência a saúde
kDa	Kilodalton
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LIKA	Laboratório de Imunologia Keizo Asami
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Ionization
MBLs	Metalo-β-lactamases
mg	Miligrama

MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	MilliMolar
NaCl	Cloreto de sódio
NDM-1	<i>New Delhi MBL</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
OXA	Oxacilinase
Pb	Pares de base
pH	<i>Potencial hidrogeniônico</i>
PBPs	<i>Penicillin-binding proteins</i>
PCR	Reação em cadeia de Polimerase
R	Resistente
rDNA	<i>Ácido desoxirribonucleico ribossomal</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription</i>
Rpm	Rotação por minuto
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
S	Sensível
Sec.	Secreção
SHV	<i>Sulphydryl reagent variable</i>
SPM-1	São Paulo MBL
STB	Secreção Traqueobrônquica
TBE	Solução tampão de Tris/Borato/EDTA
TEM	Temoniera
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UTI	Unidade de terapia intensiva
UV	Ultravioleta
V	Unidade de tensão elétrica
VIM	Verona Imipenemase
W	Unidade de potência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	O GÊNERO <i>KLEBSIELLA</i> SPP	21
2.1.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
2.2	FATORES DE VIRULÊNCIA	25
2.2.1	Cápsula polissacarídica (CPS)	25
2.2.2	Adesinas fimbriais	27
2.2.3	Biofilmes	31
2.2.4	Agentes anti-biofilme	37
2.3	β -LACTÂMICOS	38
2.4	AMINOGLICOSÍDEOS	39
2.5	POLIMIXINAS	42
2.6	RESISTÊNCIA AOS β -LACTÂMICOS	44
3	OBJETIVOS	47
3.1	OBJETIVO GERAL	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA	48
4.1	ISOLADOS BACTERIANOS	48
4.2	IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE BACTERIANA (MALDI-TOF)	48
4.3	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA	48
4.4	TIPAGEM MOLECULAR DOS ISOLADOS BACTERIANOS (ERIC-PCR) DNA	49
4.5	DETECÇÃO DE GENES E SEQUENCIAMENTO	50
4.6	FORMAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME	50
4.7	SELEÇÃO DOS ISOLADOS PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E AVALIAR ATIVIDADE SINÉRGICA	51
4.8	DETERMINAÇÃO DA CIM	51
4.9	ENSAIO DE <i>CHECKERBOARD</i>	52
4.10	SELEÇÃO DOS ISOLADOS PARA AVALIAR O EFEITO DE ANTIMICROBIANOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME E NA EXPRESSÃO DE GENES	52
4.11	EFEITO DOS ANTIMICROBIANOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME	53
4.12	EXTRAÇÃO DE RNA E EXPRESSÃO SE DE GENES <i>bla</i> _{KPC} , <i>mrkD</i> , <i>fimH</i> , <i>ecpA</i> e <i>luxS</i>	53

4.13	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	54
5	RESULTADOS	56
5.1	ARTIGO 1 - IDENTIFICAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME E GENES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> PORTADORES E NÃO PORTADORES DO GENE <i>BLA_{KPC}</i> EM PERNAMBUCO, BRASIL	56
5.2	ARTIGO 2 - IMPACTO DE CONCENTRAÇÕES SUB-INIBITÓRIAS DE ANTIMICROBIANOS SOBRE O BIOFILME DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> : EFEITO NA FORMAÇÃO, ULTRAESTRUTURA, EXPRESSÃO DO <i>BLA_{KPC}</i> E GENES RELACIONADOS AO BIOFILME	75
6	CONCLUSÕES	105
	REFERÊNCIAS	106
	APÊNDICE A - ARTIGO 1: IDENTIFICAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME E GENES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> PORTADORES E NÃO PORTADORES DO GENE <i>BLA_{KPC}</i> EM PERNAMBUCO, BRASIL.....	130
	APÊNDICE B – ARTIGO 2: IMPACTO DE CONCENTRAÇÕES SUB-INIBITÓRIAS DE ANTIMICROBIANOS SOBRE O BIOFILME DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>: EFEITO NA FORMAÇÃO, ULTRAESTRUTURA, EXPRESSÃO DO <i>BLA_{KPC}</i> E GENES RELACIONADOS AO BIOFILME.....	131

1 INTRODUÇÃO

Biofilmes microbianos têm sido associados a uma variedade de infecções persistentes que respondem fracamente a terapia com antimicrobianos convencionais. Uma alta correlação entre a produção de biofilme e resistência fenotípica a múltiplas drogas foi estabelecida, onde 80% das cepas produtoras de biofilme eram multidroga-resistentes (MDR), sendo sensíveis a carbapenêmicos e aminoglicosídeos (SUBRAMANIAN et al., 2012; DE LA FUENTE-NÚÑEZ et al., 2014; VUOTTO et al., 2017; SINGH et al., 2017). A presença e expressão de fatores de virulência como fímbrias, cápsula polissacarídica e sideróforos em isolados de *Klebsiella pneumoniae* também podem interferir na formação de biofilme (DZUL et al., 2011; MURPHY; CLEGG, 2012; BURBANK et al., 2015; ZHENG et al., 2018).

As fímbrias do tipo 1 e do tipo 3 são frequentemente encontradas em isolados de *K. pneumoniae*, enquanto a importância da fímbria do tipo 3 na formação do biofilme já tem sido demonstrada em vários estudos (SCHROLL et al., 2010; STALHUT et al., 2012; MURPHY et al., 2013; SEIFI et al., 2016), as fímbrias do tipo 1 ainda não tiveram seu papel na formação de biofilme elucidado (KLEMM; SCHEMBRI, 2000; ROSEN et al., 2008; STRUVE et al., 2009; ZUBERI et al., 2017).

A cápsula polissacarídica parece dificultar a formação de biofilme por prejudicar a expressão das fímbrias (LIN et al., 2016), entretanto já foi observado que a produção da cápsula é importante na formação de biofilme (BODDICKER et al., 2006; WU et al., 2011; ZHENG et al., 2018).

Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) grafia está correta causadas por isolados de *K. pneumoniae* com perfil fenotípico de resistência à cefalosporinas de terceira geração e a carbapenêmicos possui ampla associação com a presença de genes de resistência codificantes de ESBLs (*Extended Spectrum β -lactamases*) do tipo SHV, TEM, CTX-M e de KPC (QUEENAN; BUSH, 2007; STEINMANN, et al., 2011; BUSH, 2018). Infecções causadas por *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos são frequentemente relatadas em diversos países, representando um fenômeno de preocupação de saúde pública mundial (CALIA et al., 2017).

A associação de antimicrobianos pode reduzir a expressão de genes relacionados a produção de poli-N-acetilglucosamina, essencial para formação de biofilme por *Staphylococcus epidermidis* (GOMES et al., 2011). Adicionalmente, concentrações sub-inibitórias de carbapenêmicos reduziram a expressão de genes envolvidos na formação de biofilme, relacionados com adesinas, resposta ao estresse, síntese e metabolismo de peptideoglicanos

(VAN LAAR et al., 2015). No entanto, apesar da alta correlação de IrAS causadas por isolados de *K. pneumoniae* MDR produtores de biofilme e da dificuldade de tratamento destas infecções, são escassos os estudos que avaliem a expressão de genes de resistência e virulência em biofilmes de *K. pneumoniae* submetidos à associação de antimicrobianos. A combinação de antimicrobianos tem sido relatada como uma alternativa terapêutica promissora diante do cenário de resistência aos carbapenêmicos (TEO et al., 2015; GARCINUÑO et al., 2016).

Devido a dificuldade de tratamento de IRAS por isolados MDR de *K. pneumoniae* alguns estudos têm observado que combinações de antimicrobianos, inclusive um carbapenêmico com outro antimicrobiano apresentam um efeito sinérgico, sendo uma opção terapêutica para aqueles isolados produtores de carbapenemases (LE et al., 2011; TÄNGDÉN et al., 2014; LIM et al., 2015; BEGANOVIC et al., 2019). A redução na taxa de mortalidade em pacientes tratados com uma combinação terapêutica em relação aos tratados com monoterapia, inclusive frente a cepas produtoras de carbapenemases tem sido observada (QURESHI et al., 2012; BASS et al., 2015; TUMBARELLO et al., 2015; TZOUVELEKIS et al., 2015). Alterações morfológicas em isolados produtores de KPC foram observadas quando submetidos à sub-CIMs dos antimicrobianos meropenem e polimixina B sozinhos e em associação (SCAVUZZI et al., 2016).

As IRAS causadas por isolados de *K. pneumoniae* estão associadas a presença de genes de resistência à antimicrobianos e à produção de fatores de virulência envolvidos na formação de biofilmes bacterianos que contribuem para a evolução da infecção e dificultam o sucesso terapêutico. Diante desse contexto, este estudo teve como objetivos avaliar em isolados multidroga-resistentes de *K. pneumoniae* a presença dos genes de resistência *bla*_{KPC} e dos genes de virulência *fimH*, *mrkD*, *mrkA*, *ecpA*, *cps*, *luxS*, o perfil clonal, a atividade sinérgica do meropenem associado à amicacina e à polimixina B, a expressão dos genes *bla*_{KPC-2}, *fimH*, *mrkD*, *ecpA*, *luxS* e as alterações ultra-estruturais na formação de biofilme por isolados clínicos portadores do gene *bla*_{KPC-2}, submetidos às concentrações sub-inibitórias de meropenem, amicacina e polimixina B e das associações de meropenem com amicacina e de meropenem com polimixina B.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O GÊNERO *KLEBSIELLA* SPP.

O gênero *Klebsiella* foi denominado em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs por Trevisan em 1885 (MARTÍNEZ et al., 2004). As bactérias deste gênero foram classificadas como Gram-negativas, imóveis, geralmente encapsuladas, capazes de fixar nitrogênio (KLOPPROGGE et al., 2002; TEMME; ZHAO; VOIGT, 2012; BAO et al., 2013; LIU et al., 2017). São descritas como sendo um patógeno oportunista, causando infecção em pacientes imunocomprometidos, geralmente isolado do sistema respiratório, gastrointestinal e geniturinário, colonizando mucosas de humanos e outros mamíferos, podendo ser encontrado amplamente na natureza em plantas, solo, águas de superfície, esgotos (CHAPMAN, 1946; PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

As espécies de *Klebsiella* são o agente causador de vários tipos de infecções em humanos, incluindo infecções do trato respiratório, infecções do trato urinário (ITUs) e infecções da corrente sanguínea (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). Geralmente, essas infecções ocorrem em pacientes hospitalizados ou imunocomprometidos e são rotineiramente tratadas com β -lactâmicos e outros antibióticos eficazes contra Enterobacteriaceae (SEIBERT et al., 2014; CHUNG et al., 2016; DSOUZA et al., 2017).

A classificação das espécies de *Klebsiella* inicialmente foi realizada de acordo com as características patogênicas ou as doenças causadas, sendo inicialmente o gênero dividido por Owan (1974), em uma breve revisão da taxonomia no gênero *Klebsiella*, foram reconhecidas sete espécies: *Klebsiella aerogenes*, *K. oxytoca*, *K. edwardsii*, *K. atlantae*, *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis*. Contudo, Ørskov (1974), no Bergey's Manual of Bacteriologia (8ª edição), descreveu apenas três: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis*. Posteriormente, com os avanços da taxonomia houve uma reclassificação em cinco espécies: *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *K. terrigena*, *K. ornithinolytica* e *K. planticola*. *K. pneumoniae* apresentado três subespécies: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* e *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*. (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; MARTÍNEZ et al., 2004; BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014).

Embora tenham sido consideradas sem significado clínico e restritas aos ambientes aquático, botânico e ao solo, as espécies *K. ozaenae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. terrigena* e *K. planticola* foram relatadas em amostras clínicas humanas (PODSCHUN; ULLMANN, 1998, DRANCOURT et al., 2001; HANSEN et al., 2004; BRISSE et al., 2009). No entanto, estas

espécies foram reclassificadas taxonomicamente juntamente com a *K. ornithinolytica*, em um novo gênero chamado *Raoutella* (DRANCOURT et al., 2001).

Novas espécies deste gênero foram descritas como *K. variicola*, comum a plantas, associada também às amostras clínicas (ROSENBLUETH et al., 2004; ALVES et al., 2006; MAATALLAH et al., 2014), *K. singaporensis* (LI et al., 2004), considerada posteriormente um sinônimo heterotípico de *K. variicola* (BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014), *K. alba* (XU et al., 2010), *K. michiganensis* (SAHA et al., 2013) *K. quasipneumoniae* (BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014). As espécies de maior importância clínica são *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* e frequentemente associadas à resistência aos antimicrobianos (DROPA et al., 2009; DIAS et al., 2011; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2012; HUANG et al., 2013; MORADIGARAVAND et al., 2018).

Muitas cepas de *Klebsiella* spp. hidrolisam uréia lentamente produzindo uma cor rosa-pálida na superfície inclinada do ágar uréia Christensen, quando cultivadas em meio ágar de MacConkey formam colônias grandes, mucóides, vermelhas, indicando a fermentação de lactose e produção de ácido. Microscopicamente são vistos como bacilos Gram-negativos e quanto às características bioquímicas geralmente são oxidase, H₂S, arginina, ornitina e fenilalanina negativos, imóveis, fermentadores de glicose, descarboxilase da lisina e Voges-Proskauer e citrato positivos. A produção de indol a partir do triptofano pode ser utilizada para diferenciar duas espécies deste gênero, sendo *K. pneumoniae* indol negativa e *K. oxytoca* indol positiva (HANSEN et al., 2004; ALVES et al., 2006; KONEMAN et al., 2018).

A identificação de *Klebsiella* spp. é tradicionalmente baseada nas características morfológicas e fisiológicas, através de testes bioquímicos. Nos últimos anos, a viabilidade do uso da espectrometria de massa para identificar rapidamente microrganismos tem sido mencionada por vários estudos. A dissorção/ionização assistida por matriz (MALDI-TOF) é uma técnica sensível utilizada na espectrometria de massa, permitindo a análise de biomoléculas como proteínas, peptídeos e açúcares. São gerados espectros de massa, usados para identificar o microrganismo, e analisados pelo software apropriado e comparado com o banco de dados de espécies já existente (SANTOS et al., 2013; SINGHAL et al., 2015; DINKELACKER et al., 2018).

Dentre as infecções causadas por espécies da família Enterobacteriaceae, *K. pneumoniae* destaca-se entre os agentes infecciosos nos hospitais, sendo relacionada a índices de mortalidade, que podem variar de 20% a 40%, devido aos mecanismos de resistência que podem apresentar (XU; SUN; MA, 2017). Quase todas as enterobactérias são capazes de produzir cápsula, esta propriedade tem sido fortemente associada às infecções extra-intestinais,

tais como meningite, septicemia e infecções do trato urinário (SAHLY et al., 2008; MAATALLAH et al., 2014; DORMANAN et al., 2018; MARTIN; BACHMAN, 2018). Em *Klebsiella*, a produção de enzimas capazes de inativar a ação dos antimicrobianos e outros fatores de virulência além da cápsula, como fímbrias, sideróforos, lipopolissacarídeos contribuem para a ocorrência de infecções persistentes nos hospitais em diversos países (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; PODSCHUN; FISCHER; ULLMAN, 2001; CERQUEIRA et al., 2011; EL FERTAS-AISSANI et al., 2012; ARENA et al., 2017).

2.1.2 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae foi descrita primeiramente por Carl Friedlander, em 1882, como uma bactéria isolada de pulmões de pacientes que haviam morrido de pneumonia, conhecida também como bacilo de Friedlander, um patógeno oportunista e virulento causador de pneumonias graves (FRIEDLAENDER, 1882; HORNICK et al., 1995; VUOTTO et al., 2014). Além de causar infecções em pacientes no ambiente hospitalar, é responsável também por infecções adquiridas na comunidade, sendo os etilistas crônicos um grupo de risco para pneumonia adquirida na comunidade (LOPES et al., 2010; MARTIN; BACHMAN et al., 2018). Esta espécie bacteriana também pode estar presente em indivíduos saudáveis, colonizando principalmente o trato intestinal (prevalência de 5 a 38%) e nasofaringe (1 a 6%) de seres humanos (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

Embora seja considerado um patógeno extracelular, vários estudos revelaram a capacidade desta bactéria invadir e colonizar tecidos epiteliais (FUMAGALLI et al., 1997; OELSCHLAEGER; TALL, 1997; FAVRE-BONTE et al., 1999; SAHLY et al., 2000, 2008) a subespécie *rhinoscleromatis* é a única capaz de viver intracelularmente em macrófagos (LERY et al., 2014).

Em relação às propriedades fenotípicas, muitos estudos relataram que os isolados presentes no ambiente são quase idênticos aos isolados clínicos (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; PODSCHUN et al., 2000). Sendo indistinguíveis quanto às propriedades bioquímicas, tem sido sugerido inclusive que os isolados ambientais podem ser tão virulentos quanto os clínicos (PODSCHUN et al., 2001; STRUVE; KROGFELT, 2004; ARAUJO et al., 2019). Entretanto, estudos com metodologias avançadas de identificação, como sequenciamento genômico e espectrometria de massa, mostraram que uma porção de isolados clínicos identificados como *K. pneumoniae* são de fato outras espécies de *Klebsiella* (BERRY et al., 2015 ; LONG et al., 2017).

Klebsiella pneumoniae tem sido relatada causando abscessos hepáticos (LIU, YU; WANG; JIANG, 2013; MOORE et al., 2013; OU et al., 2017), além de estar relacionada às pneumonias associadas à ventilação mecânica (OTHMAN et al., 2017) e também às infecções do trato urinário associadas ao uso de cateteres (MAHARJAN et al., 2018). A utilização cada vez mais generalizada de antimicrobianos contribuiu para que a espécie com fenótipo multidroga-resistente fosse uma causa importante de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) em pacientes imunocomprometidos, sendo responsável por aproximadamente 8% das infecções hospitalares (WILKSCH et al., 2011; MARTIN, BECHMAN, 2018).

No ambiente hospitalar, as infecções causadas por *K. pneumoniae* aumentam de acordo com o tempo de internação do paciente. A patogênese das IRAS causada por *K. pneumoniae* tem sido associada à sua capacidade de formar biofilme, o que é preocupante, pois muitas vezes esses biofilmes são formados envolvendo dispositivos médicos implantados e as bactérias presentes nesses biofilmes são protegidas dos antimicrobianos e dos mecanismos de defesa do hospedeiro, dificultando o tratamento do paciente (CHUNG et al., 2016).

Surtos hospitalares provocados por organismos MDR, como isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs têm sido relatados em diversos países, representando uma causa importante de infecções hospitalares adquiridas, especialmente no período neonatal e a taxa de mortalidade pode ser tão alta, atingindo cerca de 70% (QURESHI et al., 2012; DURDU et al., 2016; GORREI et al., 2017; XU; SUN; MA, 2017). Cerca de 20-30% dos isolados de *K. pneumoniae* foram resistentes à cefalosporinas de amplo espectro, devido provavelmente a produção de β -lactamases, um mecanismo de resistência aos antimicrobianos mediado por plasmídeos, as infecções causadas por isolados produtores de ESBL estão associadas a taxas elevadas de mortalidade (MARTINO et al., 1997; STARZYK-ŁUSZCZ et al., 2017). Esse mecanismo de resistência confere a espécie resistência à diversos antimicrobianos, sendo esse um fator limitante e uma das maiores causas de falhas no tratamento das infecções causadas por esta bactéria (NAAS et al., 2008; PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010; HENNEQUIN et al., 2012b; SATO et al., 2015; DALMOLIN et al., 2017).

A capacidade de *K. pneumoniae* para prosperar no ambiente e em diferentes locais do corpo está relacionada em grande parte, a sua capacidade intrínseca para regular a expressão de vários fatores de virulência (TARKKANEN et al., 1992; MATATOV et al., 1999; ROSEN et al., 2016; JIANG-LI et al., 2018). *K. pneumoniae* produz fatores de virulência que contribuem para patogênese bacteriana, incluindo as adesinas fimbriais, sideróforos, antígenos S e antígenos capsulares (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; STRUVE; KROGFELT, 2004; SURGERS et al., 2016). Os fatores de virulência que predominam em *K. pneumoniae* são a

produção de cápsula polissacarídica e as fímbrias (TARKKANEN et al., 1992; MATATOV et al., 1999; SAHLY et al., 2000; VUOTTO et al., 2017).

A morbidade e mortalidade produzida por *K. pneumoniae* estão relacionados principalmente à resistência a antimicrobianos e sua capacidade de formar biofilmes (BARRETO et al., 2009; DURDU et al., 2016; FRAENKEL-WANDEL et al., 2016; RAMOS-CASTAÑEDA et al., 2018). A capacidade de formar biofilme por isolados produtores de ESBL já foi verificada, assim como, a presença de fímbrias e cápsula e a expressão de genes *ecpA*, *fimH*, *mrkA* associados à colonização (CRUZ-CÓRDOVA et al., 2014).

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

2.2.1 CÁPSULA POLISSACARÍDICA (CPS)

Cápsula é um envelope que envolve a bactéria da maioria das espécies bacterianas, conferindo um fenótipo mucóide (ROBERTS, 1996). As CPSs são geralmente compostas de uma camada viscosa de carboidratos que estão covalentemente ligados à parede celular em bactérias Gram-positivas ou frequentemente a lipídios da membrana externa em muitas bactérias Gram-negativas (CRESS et al., 2014).

A CPS se comporta como um polímero hidrogel, atuando como uma esponja iônica, dificultando a passagem de soluções para o citoplasma, sendo ela mais hidratada em condições com menores concentrações de eletrólitos do que em altas concentrações. A organização e hidratação da cápsula são alteradas em um ambiente osmótico, sem modificar a pressão de turgência citoplasmática. No entanto, quando a cápsula não está presente ocorre uma mudança extrema na pressão de turgência em condições osmóticas alteradas. Dessa forma, a CPS atua amortecendo o impacto do estresse osmótico, sendo interessante encontrar substâncias que possam ser usadas junto aos dispositivos médicos invasivos que alterem as propriedades da CPS (WANG et al., 2013a; WU et al., 2015).

A CPS consiste em unidades repetidas de polissacarídeos, desempenha um papel na evasão do sistema imunitário por resistir à fagocitose (DOMENICO et al., 1994; VUOTTO et al., 2017), aos peptídeos antimicrobianos, por limitar a interação, e aos efeitos bactericidas do soro humano (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; CAMPOS et al., 2004; JACOBSEN et al., 2008; HSU et al., 2011). Os polissacarídeos capsulares são moléculas bastante hidratadas (COSTERTON; IRVIN, 1981; ROBERTS, 1996; RENDUELES et al., 2013) que protegem as bactérias da dissecação, retendo a umidade, possibilitando a sobrevivência em ambientes hostis

(JACOBSEN et al., 2008; RENDUELES et al., 2013). Além disso, essa barreira tem papel na aderência (ROBERTS, 1996; HSU et al., 2011), contribui para estágios iniciais e maturação do biofilme (SCHEMBRI et al., 2005; GONÇALVES et al., 2014) e induz citotoxicidade na infecção de células epiteliais pulmonares (CRESS et al., 2014).

A CPS parece ser essencial para formação de biofilme em *E. coli* (GOLLER; SEED, 2010). As bactérias deficientes na produção de cápsula aumentaram a formação de biofilme (RENDUELES; KAPLAN; GHIGO, 2013). Em *K. pneumoniae* foi visto que um operon responsável pela produção de exopolissacarídeos pode alterar características da superfície celular e diminuir a capacidade de formar biofilme, já que atua indiretamente na regulação da expressão de fímbrias do tipo 3 (HUERTAS et al., 2014). Nessa mesma espécie, em outro estudo, *in vitro*, foi silenciado o cluster gênico responsável pela biossíntese da cápsula de polissacarídica e então uma quantidade menor de cápsula e maior de biofilme foi produzida (HUANG; TZU-WEN et al., 2014).

A CPS é um dos mecanismos de virulência mais importante e essencial para colonização do trato urinário pela espécie *K. pneumoniae* (CAMPOS et al., 2004; REGUÉ et al., 2004; CLEGG, MURPHY et al., 2016). A CPS desempenha um papel crítico na proteção de isolados de *K. pneumoniae* contra mecanismos de defesa do hospedeiro (DOMENICO et al., 1994; SCHEMBRI et al., 2005; SAHLY et al., 2008; XU; SUN; MA, 2017). A CPS inibe a ativação ou absorção dos componentes do sistema complemento principalmente C3b, inibem também a diferenciação e a capacidade funcional dos macrófagos *in vitro*. As CPSs encontradas em *K. pneumoniae* apresentam 78 sorotipos diferentes, dentre os quais se destacam K1 e K2, pois as cepas que contêm esses sorotipos apresentam uma maior virulência quando comparada as possuidoras dos outros sorotipos (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; HSU et al., 2011; FEIZABADI; RAJI; DELFANI, 2013; LIN et al., 2014). Estudos têm mostrado que o sorotipo capsular parece não influenciar na resistência à fagocitose, mas sim a quantidade de CPS presente (PAN et al., 2008; MARCH et al., 2013).

A CPS impede a expressão de β -defensinas das células epiteliais respiratórias (MORANTA, 2010), neutraliza atividade de peptídeos antimicrobianos (LLOBET; TOMÁS; BENGOCHEA, 2008). Além disso, sugere-se que por dificultar a ligação às células do hospedeiro e internalização da bactéria, a CPS induz uma resposta imunológica defeituosa, inclusive a maturação das células dendríticas e a produção de citocinas pró-inflamatórias Th1 (EVRARD et al., 2010; GOMEZ-SIMMONDS, UHLEMANN, 2017; BENGOCHEA, PESSOA, 2018).

O locus gênico responsável pela biossíntese da CPS é o *cps*, encontrado em *E. coli* e semelhantemente em *K. pneumoniae* (WHITFIELD, 2006). Uma variante hipervirulenta de *K. pneumoniae* tem sido relatada e associada a um fenótipo de hipermucoviscosidade que reflete em um aumento da produção de cápsula, parcialmente regulada pelo gene *rmpA* (CHENG et al., 2010; SHON; BAJWA; RUSSO, 2013; ZHAN et al., 2017). Alguns estudos verificaram que a presença de antimicrobianos como polimixina, ceftazidima e ciprofloxacina podem estimular a produção de CPS (HELD et al., 1995; CAMPOS et al., 2004; HSU et al., 2011; CATALÁN-NÁJERA et al., 2017).

Diante da importância da CPS para a virulência bacteriana, alguns estudos têm sido realizados em busca de drogas anti-virulência. Estudos têm investigado substâncias que atuem na síntese de cápsula polissacarídica, embora não atuem diminuindo o crescimento bacteriano pode reduzir o potencial de infecção dos patógenos (BENGHEZAL et al., 2007; RASKO; SPERANDIO, 2010; STANDISH et al., 2012; LIN et al., 2013).

2.2.2 ADESINAS FIMBRIAIS

As fímbrias ou pili são longos filamentos de estrutura polimérica proteica localizado na superfície bacteriana, diferentemente dos flagelos são numerosos, não têm relação com a motilidade e são bem mais finos e menores, normalmente possuem 5-10 nm de diâmetro e até 2 µm de comprimento. As fímbrias funcionam como organelas celulares para fixação às células e/ou superfícies mucosas; sendo frequentemente denominadas adesinas (DUGUID, 1959; KONEMAN et al., 2018), desempenhando um importante papel na aderência, para que as bactérias se fixem as células (DUGUID, 1959; WANG et al., 2017).

As fímbrias frequentemente encontradas em *K. pneumoniae* são diferenciadas de acordo com sua atividade hemaglutinante: as fímbrias que têm a sua aglutinação com eritrócitos inibida pela D-manose são designadas manose-sensíveis ou fímbria tipo 1, enquanto que as fímbrias que não tem a aglutinação inibida pela manose são chamadas manose resistentes ou fímbrias tipo 3 (DUGUID, 1959; GERLACH; CLEGG; ALLEN, 1989; GUIMARÃES, BENITO et al., 2004; PACZOSA, MECSAS; 2016).

A adesão microbiana, mediada pelas fímbrias, aos tecidos hospedeiros é uma etapa extremamente necessária ao desenvolvimento da infecção (STRUVE et al., 2009; TORTORA et al., 2016). Nesta etapa as adesinas fimbriais se unem especificamente a receptores moleculares na superfície das células ou dos dispositivos, facilitando a aderência aos tecidos específicos do hospedeiro (KLEMM; SCHEMBRI, 2000; TORTORA et al., 2016). As fímbrias

também são importantes para fixação inicial das bactérias aos cateteres ou a outros dispositivos médicos, contribuindo assim para formação de biofilmes nestes dispositivos (JACOBSEN et al., 2008; MURPHY et al., 2013; BANDEIRA et al., 2017).

Klebsiella pneumoniae produz, principalmente, dois tipos de fímbrias, as do tipo 1 e do tipo 3 (GERLACH; CLEGG; ALLEN, 1989; SAHLY et al., 2008). São estruturalmente e mecanicamente diferentes, estando essas diferenças atreladas provavelmente as funções que desempenham (SCHROLL et al., 2010; CHEN et al., 2011, MURPHY et al., 2013). Essas fímbrias são constituídas, principalmente, por monômeros de estrutura principal protéica, com massa molecular média de 20 kDa e subunidades de adesinas, sendo as estruturas monoméricas principais FimA e MrkA nas fímbrias do tipo 1 e 3, codificadas pelos genes *fimA* e *mrkA*, respectivamente, podendo ser cromossômicos ou plasmidiais (SHARON, 1987; WITKOWSKA et al., 2005; ALCANTAR-CURIEL et al., 2013; MADSEN et al., 2016).

As fímbrias do tipo 1 são manose-específicas, expressas em muitas espécies de enterobactérias, enquanto que as do tipo 3 são específicas para o colágeno IV e V, e encontram-se presentes na maioria dos isolados de *Klebsiella* (FADER; DAVIS, 1980; FADER et al., 1981; WITKOWSKA et al., 2005; ALCANTAR-CURIEL et al., 2013). As fímbrias do tipo 1 são finas, rígidas, bastante comuns em espécies da família Enterobacteriaceae, expressas por diversas espécies desempenhando um papel importante na patogênese bacteriana (KLEMM; SCHEMBRI, 2000; OFEK, ITZHAK et al., 2003; SAHLY et al., 2008; PACZOSA, MECSAS, 2016). Outros gêneros, além de *Klebsiella*, também expressam fímbrias do tipo 3 como *Providencia*, *Proteus*, *Enterobacter* e *Serratia* (STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2009; SCHAFER, PEARSON et al., 2015; AZEVEDO et al., 2018).

As fímbrias do tipo 1, presentes em *Klebsiella* tem sido mais extensivamente estudada em *Escherichia coli*, mas sabe-se que as estruturas fimbriais do tipo 1 em *K. pneumoniae* são homólogas às de *E. coli* em relação à composição da regulação gênica (GERLACH; CLEGG; ALLEN, 1989; WITKOWSKA et al., 2005; STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2009).

As fímbrias do tipo 1 exercem as suas propriedades adesivas em virtude da adesina FimH, um componente menor localizado na ponta da fímbria (CHOUDHURY, 1999; STRUVE et al., 2008). A adesina FimH, codificada pelo gene *fimH*, reconhece manose contendo glicoproteínas que estão presentes em muitos tecidos do hospedeiro mamífero, tais como a superfície das células do aparelho urinário. Isto permite que as bactérias se fixem e eventualmente colonizem o uroepitélio (MARTINEZ et al., 2000; TCHESNOKOVA et al., 2011; FEENSTRA et al., 2017). Dessa forma, as fímbrias do tipo 1 desempenham um papel

importante na infecção do trato urinário causadas por *E. coli* e *K. pneumoniae* (SAHLY et al., 2008; FEENSTRA et al., 2017).

Além disso, as fímbrias do tipo 1 promovem a adesão e invasão bacteriana, assim como a formação de biofilmes, as quais são características intimamente associadas com a virulência bacteriana (SCHEMBRI et al., 2005, PACZOSA, MECSAS; 2016). Ambas as fímbrias do tipo 1 e 3 estão expressas na formação do biofilme (STAHLHUT et al., 2012, 2013; CRUZ-CORDOVA et al., 2014; PACZOSA, MECSAS, 2016). No entanto, segundo alguns autores, as fímbrias do tipo 3 contribuem fortemente para formação de biofilmes em superfícies abióticas (SCHEMBRI et al., 2005; STRUVE et al., 2009, LIN et al., 2017), já as do tipo 1 não (SCHROLL et al., 2010, STAHLHUT et al., 2012, 2013; KHANAL et al., 2015).

Estudo sobre o mecanismo que o gene *fimK* que participa da regulação da expressão da fímbria do tipo 1 mostrou que este gene atua positivamente na expressão de fímbrias do tipo 1, podendo levar a redução dos níveis intracelulares de c-di-GMP afetando negativamente a expressão de outras estruturas de superfície, como as fímbrias do tipo 3 (WANG, ZHE CHONG et al., 2013; WILKSCH et al., 2011; LIN et al., 2017). As fímbrias do tipo 3 medem 2-4 nm de largura e 0,5-2 µm de comprimento, predominantemente compostas por uma proteína de subunidade grande MrkA, além da adesina MrkD (ALLEN; GERLACH; CLEGG, 1991; ONG et al., 2008). Estas fímbrias do tipo 3 pertencem à classe das fímbrias “usher chaperone” codificadas pelo cluster gênico *mrk*, o qual inclui o gene *mrkA* que codifica a subunidade principal fimbrial e o gene *mrkD* codifica a adesina fimbrial responsável pela aglutinação de eritrócitos pelo mecanismo manose resistente (STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2009; ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013).

As fímbrias do tipo 3 são capazes de mediar à ligação de *Klebsiella* spp. às diversas células humanas, tais como as endoteliais e epiteliais do trato respiratório e urinário (TARKKANEN et al., 1997; SAHLY et al., 2008; STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2009). Esse tipo de fímbria pode mediar à ligação ao tecido alvo utilizando a adesina MrkD que está associado com a proteína fimbrial MrkA. A formação de biofilmes *in vitro* por isolados de *K. pneumoniae* foi influenciada pela produção de fímbrias na superfície bacteriana, facilitando a formação do biofilme. No entanto, a proteína MrkD parece não ser necessária para uma rápida e eficiente formação de biofilme, embora seja requerida para adesão às proteínas da matriz extracelular. O principal componente estrutural da fímbria do tipo 3 (MrkA) é uma proteína hidrofóbica, e sua hidrofobicidade pode facilitar as interações bacterianas que conduzem a um crescimento eficiente como biofilme (LANGSTRAAT; BOHSE; CLEGG, 2001). A fímbria do

tipo 3 demonstrou mediar a adesão às estruturas de colágeno, em ensaios de aderência utilizando linhagens celulares (TARKKANEN et al., 1997; STRUVE et al., 2009).

As fímbrias do tipo 3 parecem desempenhar duas funções importantes para a bactéria, a de promover a interação com receptores específicos das células e tecidos do hospedeiro e a de facilitar o crescimento da bactéria como biofilme (LANGSTRAAT; BOHSE; CLEGG, 2001; STAHLHUT et al., 2012, 2013). A proteína MrkH foi implicada na regulação positiva da expressão de genes responsáveis pela produção de fímbrias de tipo 3, através da ligação a regiões reguladoras de DNA para estes genes e iniciadores da expressão. Essa ligação ocorre somente quando a proteína MrkH é estimulada por uma pequena molécula, a c-di-GMP, onde enzimas bacterianas produzem ou quebram o c-di-GMP para controlar a sua concentração dentro da célula, e assim modulam a atividade MrkH. A compreensão da base molecular para estes processos pode levar ao desenvolvimento de compostos terapêuticos, possivelmente, para a incorporação em materiais para dispositivos médicos para inibir a formação de biofilme e patogênese (WILKSCH et al., 2011; PERCIVAL et al., 2015). Outro regulador transcricional da fímbria tipo 3, o gene *mrkHI*, também atua na formação do biofilme (JOHNSON et al., 2011; LIN et al., 2017).

A CPS e as fímbrias são componentes estruturais da superfície celular de *K. pneumoniae* e desempenham papéis importantes na sua sobrevivência e patogenicidade. Alguns estudos relatam a interferência da CPS em outros mecanismos de virulência como as fímbrias e formação de biofilmes. Isolados encapsulados tiveram a sua adesão às células epiteliais parcialmente inibidas e expressaram uma menor quantidade de adesinas, podendo ser a CPS responsável por estes eventos (FAVRE-BONTE; JOLY; FORESTIER, 1999; CLEMENTS et al., 2008). Esta relação também foi verificada por outros autores, em que os isolados encapsulados aderiram mal às células epiteliais e apresentaram menor poder de invasão (SAHLY et al., 2000), indicando que a função das fímbrias pode ser prejudicada devido à presença da CPS. Adicionalmente, foi demonstrado que a CPS interfere, mas não anula o funcionamento das fímbrias, pois não afeta a quantidade de fímbria produzida. A presença de uma CPS espessa parece impedir que a fímbria tipo 1 inicie a formação do biofilme, já que a inibição da síntese da cápsula melhora o funcionamento desta fímbria (SCHEMBRI et al., 2005; GONÇALVES et al., 2014).

No entanto, há relatos conflitantes na literatura quanto à expressão simultânea de CPS e fímbrias por *K. pneumoniae*, onde numa investigação preliminar, onde foi relatado que de 32 isolados encapsulados de *K. pneumoniae* provenientes de ITU, 29 foram capazes de expressar fímbria do tipo 1 (TARKKANEN et al., 1992). Por outro lado, Matatov et al. (1999)

identificaram uma relação inversa entre cápsula e a expressão da fímbria do tipo 1, examinaram isolados de *K. pneumoniae* derivados de sepses e de ITU e mostraram que os isolados de sepsse encapsulados não produziram as fímbrias do tipo 1, enquanto que a maioria dos isolados de ITU que expressavam as fímbrias do tipo 1 não eram encapsulados. Esses dados indicam que os isolados encapsulados são incapazes de expressar fímbrias funcionais.

A ausência da CPS, resultou em um aumento na formação de biofilme, indicando que na ausência da CPS, as fímbrias do tipo 1 assumem um papel importante na formação de biofilme (HUANG et al., 2014). Além das fímbrias do tipo 1 e 3, outras fímbrias têm sido descritas estando associadas ao aumento da formação de biofilme, como a kpc, sendo mais prevalente em isolados de *K. pneumoniae* sorotipo K1 (WU, CHIEN-CHEN et al., 2010).

Outro tipo de fímbria denominada de Pilus Comum *Escherchia coli* (ECP) pode ser encontrada, sendo altamente conservadas entre espécies entéricas, tais como *Klebsiella* spp. e *K. pneumoniae* (98% e 97%, respectivamente) (GARNETT et al., 2012). ECP é uma fímbria peritríquia fina de quatro nm de espessura, flexível e composta por subunidades de pilina codificada pelo gene *ecpA* (RENDÓN et al., 2007). Uma frequência superior a 90% do gene *ecpA* entre isolados clínicos de *K. pneumoniae* tem sido relatada (ALCANTAR-CURIEL et al., 2018). A expressão desse gene por isolados de *K. pneumoniae* é relacionada à capacidade de formação de biofilme, sendo inclusive mais prevalente em relação ao gene *fimH* (CRUZ-CÓRDOVA et al., 2014; ALCANTAR-CURIEL et al., 2018).

2.2.3 BIOFILMES

A existência dos biofilmes já é conhecida há algum tempo. Zobell, em 1943, foi provavelmente o primeiro a registrar essa observação em detalhes (CHARACKLIS; MARHALL, 1990; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994), ele sugeriu que o processo de colonização microbiana ocorre em duas etapas: uma fase inicial reversível seguida por uma ligação irreversível entre a célula e a superfície (CHARACKLIS; MARHALL, 1990). Após o primeiro registro, pesquisadores têm demonstrado a existência dos biofilmes em diversos ambientes em cascos de navios, sistemas de distribuição de água e petróleo, cáries dentais, dispositivos e implantes médicos (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; HOIBY, 2017; DE CARVALHO et al., 2018; STEFFESN, MARCANTONIO, 2018).

Em 1992, os biofilmes foram definidos como uma estrutura porosa e complexa formada por uma ou mais espécies de microrganismos imobilizados a uma superfície ou substrato, formam microcolônias circundadas de grande quantidade de exopolissacarídeos constituindo

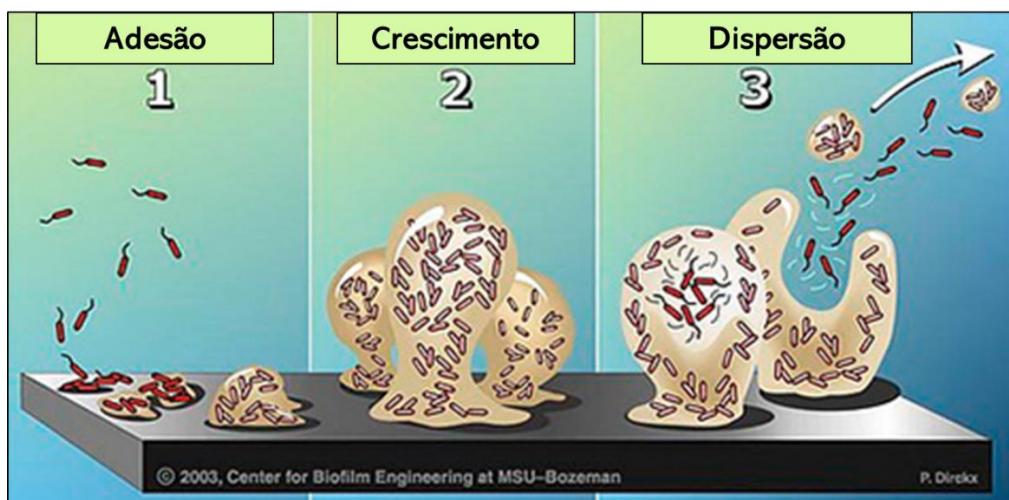
uma matriz polimérica orgânica originada por bactérias, podendo reter substâncias inorgânicas no interior da matriz (COSTERTON, 1999; COSTERTON et al., 1994; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; HALL, MAH, 2017). Entre as microcolônias formadas existem canais de circulação e armazenadmento de água que promovem o influxo de nutrientes e o efluxo de produtos de metabolismo. Análises bioquímicas da estrutura dos exopolissacarídeos revelam que os biofilmes são hidrogéis (CORONA-IZQUIERDO; MEMBRILLO-HERNÁNDEZ, 2002; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; RABIN et al., 2017).

A formação do biofilme pode ser dividida em estágios (Figura 1), no primeiro, forma-se uma camada de acomodamento que será a base sobre a qual o biofilme irá se desenvolver sendo apresentada uma superfície à bactéria, esse processo é acionado por forças gravitacionais e movimento browniano e influenciado por forças hidrodinâmicas circundantes (DONLAN, 2002; GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008; KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; HULTGREN, 2015).

Posteriormente, as células microbianas planctônicas são transportadas a partir de grandes quantidades de líquido para a superfície quer por forças físicas ou por adesinas ou flagelos. As forças físicas associadas à essa adesão bacteriana incluem a de Van der Waals, interações de natureza espacial e eletrostática, hidrofóbico-hidrofílico, interações osmóticas e termodinâmicas. Essa fase de crescimento bacteriano é logarítmica e pode ocorrer em apenas alguns segundos, sendo reversível (APARNA; YADAV, 2008; GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008; KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; HULTGREN, 2015), podendo as bactérias se separarem devido a forças hidrodinâmicas, de repulsão (DUNNE, 2002; THOMEN et al., 2017) ou em resposta a disponibilidade de nutrientes (WU, OUTTEN, 2009; YAWATA et al., 2016).

Em um terceiro estágio, as células que resistem às forças de cisalhamento mantendo-se imobilizadas firmemente aderidas à superfície tornando-se irreversivelmente aderidas, sendo importantes nessa etapa flagelos, fímbrias e pili para vencer as forças repulsivas, assim como a interação de propriedades hidrofóbicas-hidrofílicas das superfícies (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008; KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; HULTGREN, 2015). A medida que as células estacionárias se dividem, células filhas espalham-se para formar aglomerados. Ocorre uma expressão diferente de genes entre os estados sésil e planctônico. A produção de flagelos é reduzida, a motilidade é diminuída, já a expressão do número de genes para produção de proteínas celulares de superfície e excreção de produtos é aumentada (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008; HALL MAH et al., 2017).

Figura1: Esquema das etapas de formação do biofilme.



Fonte: Center for Biofilm Engineering da Montana State University (2003), com modificações.
<http://www.biofil.montana.edu/multimedia/images/download.html?id=1093>
 (imagem acessada em 20/02/2019)

Posteriormente, a fase estacionária de crescimento descreve uma fase em que a taxa de divisão celular é igual à taxa de morte celular. Na presença de uma alta densidade celular, vários mecanismos de sinalização celular são encarregados do biofilme, conhecido como *quorum sensing*, onde auto-sinalizadores estimulam a expressão gênica de mecanismos importantes para a matrix extracelular. Por fim, há a dispersão do biofilme, enzimas produzidas pelo biofilme desmembra os polissacarídeos que agregam o biofilme, as bactérias se soltam, ficando livres para colonizar outros substratos (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008; KUMAR et al., 2017; FLEMING; RUMBAUGH, 2018). As células aderidas irreversivelmente as superfícies ao se dividirem formam microcolônias e produzem polímeros extracelulares que definem um biofilme. Estas substâncias poliméricas extracelulares consistem principalmente de polissacarídeos e podem ser detectados microscopicamente e por análise química. Os biofilmes são altamente hidratados (98% de água) e fortemente ligados à superfície subjacente (LIM et al., 2015; ROZEJ et al., 2015).

Portanto, os biofilmes são compostos principalmente de células microbianas e de uma matriz composta principalmente por um aglomerado de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Essa matriz polimérica pode variar em propriedades químicas e físicas, mas é principalmente composta por polissacarídeos. Os biofilmes desenvolvidos sobre dispositivos médicos podem ser formados por apenas um tipo de microrganismo ou microrganismos associados, como fungos e bactérias de diferentes espécies (DONLAN, 2002; FOURIE et al., 2016; BUDZYNSKA et al., 2017).

A formação dos biofilmes pode ser benéfica ou prejudicial ao ambiente em que se formam. Na indústria de processamento de alimentos a formação de biofilmes pode ser benéfica, como é o caso da fabricação de vinagre onde o crescimento dos microrganismos aumenta a área de superfície favorecendo a conversão do substrato em produto (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; ROSSI et al., 2016; GALIÉ et al., 2018).

Células crescidas em biofilme apresentam algumas propriedades distintas das células planctônicas, uma delas é a resistência aumentada aos antimicrobianos (MAH; O'TOOLE, 2001; DE CAMPOS et al., 2016). A estrutura química e física dos biofilmes ou outros aspectos da arquitetura do biofilme podem ser responsáveis por conferir essa resistência elevada, já que as células no centro de biofilmes ficam protegidas de forças químicas e físicas tais como de antimicrobianos e de descamação (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; LIMOLI et al., 2015).

As células que existem num biofilme, podem se tornar 10-1000 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos que as planctônicas, causando um enorme impacto na medicina, já que tem sido estimado que os biofilmes estejam associados a 65% das IRAS, os quais apresentam empecilhos na terapia antimicrobiana elevando os custos do tratamento destas infecções (MAH; O'TOOLE, 2001; JAMAL et al., 2018). Estudos indicam que a maioria dos cateteres vasculares são colonizados por microrganismos presentes em biofilmes (TORTORA et al., 2017).

A matriz exopolissacarídica (ou outros componentes dos biofilmes) não forma uma barreira impenetrável à difusão de agentes antimicrobianos. No entanto, para certos agentes, a matriz de exopolissacarídeo representa uma barreira inicial que pode dificultar a penetração do agente antimicrobiano (MAH; O'TOOLE, 2001; SINGH et al., 2016).

Células crescidas em uma condição de limitação nutricional causa um *stress* na bactéria e a transição de um crescimento exponencial ou crescimento lento ou nulo geralmente leva a um aumento da resistência, é possível ainda que essa taxa de crescimento lenta seja devido ao estresse, e não a limitação nutricional (MAH; O'TOOLE, 2001; SUGIMOTO et al., 2018). Além disso, a estrutura do biofilme promove um ambiente ideal para troca de DNA extracromossomal, pois devido à proximidade maior das células a conjugação ocorre melhor entre células no biofilme do que em células planctônicas. Dessa forma, os organismos dentro de biofilmes podem facilmente adquirir resistência através da transferência de plasmídeos de resistência (DONLAN, 2002; ALDECOA et al., 2017).

A adaptação genética dos microrganismos é fundamental para sua sobrevivência e pode ter origem quer em mutações ou recombinações dentro do seu próprio genoma, quer na aquisição de novo material genético proveniente de outros micro-organismos, onde a formação

de biofilme facilita essa adaptação a novos ambientes (AZEVEDO; CERCA, 2012; GRANT et al., 2016). Fatores ambientais podem promover a formação de biofilme bacteriano contribuindo positivamente para a resistência antimicrobiana (POOLE, 2012; DE LA FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013). Adicionalmente, tem sido mostrado que sub-CIMs de antimicrobianos podem induzir a formação de biofilme bacteriano. Sub-CIMs de antimicrobianos β -lactâmicos induzem significativamente à formação de biofilmes em algumas cepas de *S. aureus* (KAPLAN et al., 2012). Resultado semelhante foi obtido com um isolado de *K. pneumoniae* portador do gene *bla*_{CTX-M-15}, quando submetido à cefotaxima em baixas concentrações (HENNEQUIN et al., 2012b).

O uso generalizado de antimicrobianos como promotores de crescimento na agropecuária pode expor as bactérias a baixos níveis das drogas. Níveis baixos de β -lactâmicos, uma classe amplamente utilizada em ambientes clínicos e agrícola causou uma auto-agregação significativa e a formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* (KAPLAN et al., 2012). Por outro lado, concentrações sub-inibitórias de ceftazidima causaram uma diminuição na formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (OTANI et al., 2018). Estudos têm mostrado que as concentrações sub-inibitórias podem ter diversos efeitos em biofilmes bacterianos, variando da inibição ao estímulo do crescimento sésil e variando em relação às espécies e linhagens bacterianas (STOITSOVA et al., 2016; SATO et al., 2018; SRITHARADOL et al., 2018). Outros fármacos, como a hidroclorotiazida, também estimulam a formação de biofilme, não apenas os antimicrobianos (CADAVID et al., 2018).

Além disso, a formação de biofilmes, principalmente em *K. pneumoniae* está relacionada a fatores de virulência como a presença de cápsula e fímbrias do tipo 1 e do tipo 3. Esta relação vem sendo descrita em estudos juntamente com outros fatores que parecem influenciar a formação de biofilme. Segundo Schroll et al. (2010) a formação *in vitro* do biofilme pode ser influenciada pelo meio de cultura, no entanto não foi observada a correlação entre a quantidade de biofilme formado e a composição do meio, quanto à quantidade de nutriente.

Além das fímbrias, o ferro é um elemento essencial para o crescimento bacteriano com participação em processos de transporte de oxigênio e elétrons, essenciais para a formação de biofilme, onde regula a motilidade em superfícies, promove a formação de biofilme e estabiliza a matriz de polissacarídeo. Assim, reduzir a disponibilidade de ferro tem sido proposto como um potencial meio para prejudicar o desenvolvimento de biofilme por isolados de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Escherichia coli* (CHHIBBER; NAG; BANSAL, 2013). Um regulador de ferro, o IscR (*Iron-Sulfur Cluster Regulator*), controla a formação de biofilmes

em resposta a alterações na homeostase celular de co-fatores de ferro. O IscR regula ainda a expressão de fímbrias de tipo 1 em *E. coli*, contribuindo para a formação de biofilme (WU; YUN; OUTTEN, 2009).

Um estudo verificou que isolados de *K. pneumoniae* mutantes com inserções de transposons dentro do loci *wza* e *wzc* da CPS foram deficientes na formação de biofilme (WU et al., 2011). A diminuição da produção da CPS pode ser responsável pela diminuição da formação de biofilme (BODDICKER et al., 2006). Genes da CPS, como *wza* e ORF14 são importantes para a fase inicial da formação de biofilme por *K. pneumoniae* (BALESTRINO et al., 2008).

LEE et al. (2008) verificaram que isolados de *Acinetobacter baumannii* que possuíam o gene que codifica para produção da β -lactamase PER-1 formaram biofilme em maior quantidade do que os isolados sem o gene que confere a produção dessa β -lactamase. A expressão de β -lactamases das classes A e D prejudicaram a formação de biofilme por isolados de *E. coli* e *P. aeruginosa*. No entanto, plasmídeos idênticos que carregam β -lactamases da classe B ou C, relacionadas à resistência tetraciclina ou gentamicina não diminuem a formação de biofilme, propondo que essas enzimas interferem na remodelação de peptídeoglicanos necessários para formação de grandes complexos macromoleculares relacionados à adesão bacteriana às superfícies e subsequente desenvolvimento do biofilme (GALLANT et al., 2005). Em *K. pneumoniae* plasmídios que codificam ESBLs impediram a adesão bacteriana (HENNEQUIN; FORESTIER, 2007).

Os antimicrobianos ou agentes anti-biofilme podem promover a formação de espécies reativas ao oxigênio, o que contribui para a morte celular. Esses antimicrobianos e também nano partículas de prata que promovem a formação de espécies reativas ao oxigênio podem inibir o desenvolvimento de biofilme por *E. coli* e *K. pneumoniae* (KUCZYŃSKA-WIŚNIK et al., 2010; QAYYUM et al., 2017).

O desenvolvimento de biofilme está relacionado ao processo de *quorum sensing*. O *quorum sensing* é um mecanismo de comunicação célula-célula que sincroniza a expressão dos genes em resposta ao limiar de densidade populacional atingido (SOLANO et al., 2014). A sinalização célula-célula desempenha um papel na adesão celular e, portanto, na formação de biofilmes (DONLAN, 2002; WANG et al., 2016; VUOTTO et al., 2017). A formação de biofilme em *K. pneumoniae* é complexa e envolve vários mecanismos de regulação. *Quorum sensing* modula a formação de biofilme através da síntese de lipopolissacarídeo em *K. pneumoniae* (DE ARAUJO et al., 2010; SUN et al., 2016).

O Autoindutor-2 (AI-2) é uma molécula sinalizadora produzida pela LuxS, uma enzima encontrada em muitas espécies bacterianas, responsável por viabilizar a comunicação interespecífica (PEREIRA et al., 2013). O gene *luxS* é necessário para a síntese de AI-2 (BALESTRINO et al., 2005), sendo indispensável nos estágios iniciais da formação de biofilme (SUN et al., 2016). Em *K. pneumoniae* o *quorum sensing* é dependente do gene *luxS* (ZHU et al., 2011).

A utilização de bloqueadores desse sinal de *quorum sensing* para atenuar a patogenicidade bacteriana tem sido estudada como uma alternativa, principalmente diante da emergência de bactérias MDR (ANBAZHAGAN et al., 2012, CHUNG, TOH, 2014, ROY et al., 2018). Além disso, tem sido sugerido que os processos de desenvolvimento e diferenciação de microcolônias podem ser de grande interesse como alvos para novas estratégias para controlar o biofilme; já que a morte celular programada, uma característica essencial de organismos superiores, pode também desempenhar um papel fundamental na diferenciação celular e desenvolvimento contínuo de microcolônias de procariotos (WEBB et al., 2003).

2.2.4 AGENTES ANTI-BIOFILME

Devido aos impactos causados pelos biofilmes, a busca por agentes com ação antibiofilme têm aumentado, vários estudos têm sido publicados, investigando agentes de origem variada. Vários estudos com esta abordagem vêm sendo realizados incluindo pesquisas com extratos de frutas eficazes diante o biofilme formado por isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtores de *AmpC* (KUMAR et al., 2014), blueberry contra biofilme de *S. epidermidis* (ZIMMER et al., 2014), plantas da Caatinga frente biofilme de *P. aeruginosa* (TRENTIN et al., 2013), moléculas antagonistas de Ferro e bacteriófagos associados com a terapia antimicrobiana para prevenir o desenvolvimento de biofilme (CHHIBBER; NAG; BANSAL, 2013); biosurfactantes com propriedades anti-adesivas e anti-biofilme frente a *A. baumannii*, *E. coli* e *S. aureus* (SAMBANTHAMOORTHY et al., 2014); e peptídeos que atuam na resposta celular ao estresse, impedindo a formação de biofilme (DE LA FUENTE-NÚÑEZ et al., 2014).

Algumas moléculas sintéticas têm sido testadas, apresentando efeitos antibiofilme (MOSHIRI et al., 2018; PARRINO et al., 2019), peptídeos antibiofilme podem inibir o desenvolvimento de biofilmes de diferentes espécies bacterianas (PLETZER, HANCOCK, 2016), bacteriófagos, enzimas também têm mostrado efeitos satisfatórios impedindo a formação de biofilme (SADEKUZZAMAN et al., 2015).

Óleos essenciais de variadas origens também têm sido revelados como agentes anti-biofilme, o óleo essencial de sementes de cominhos pode ser útil por si só ou em combinação com agentes antimicrobianos, para tratar infecções bacterianas. Foi observado aumento da eficácia antibacteriana de ciprofloxacina por esse óleo essencial, com alguns danos causados na parede celular ou alteração das proteínas de membrana externa contra *K. pneumoniae* (DERAKHSHAN; SATTARI; BIGDELI, 2010). Outros óleos essenciais têm apresentando eficácia frente à diversos microrganismos (SCHILLACI et al., 2008; KAVANAUGH; RIBBECK, 2012; BERSAN et al., 2014; BILCU et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014; QUINTAS et al., 2015), interferindo inclusive na expressão de fatores de virulência (KIM, BEOM-SU et al., 2015).

2.3 β -LACTÂMICOS

Um dos principais tipos de antimicrobianos, tanto do ponto de vista histórico quanto médico, corresponde ao grupo dos β -lactâmicos que incluem as penicilinas, cefalosporinas e cefamicinas, todos com aplicação médica. Os antimicrobianos β -lactâmicos formam um grupo de antimicrobianos que contém em sua estrutura o anel β -lactâmico heterocíclico de quatro membros (MADIGAN, 2010). Os antimicrobianos β -lactâmicos são prescritos com frequência, compartilhando uma estrutura e mecanismo de ação comum: a inibição da síntese da parede celular bacteriana formada por peptideoglicanos (GOODMAN; GILMAN, 2012). Em suas estruturas químicas, todos os β -lactâmicos tem um elemento estrutural farmacotrófico em comum, o anel azetidinona de quatro membros ou anel β -lactâmico, que na maioria dos antimicrobianos esse anel central é fundido a outro anel de cinco (tiazolidínico) ou seis membros (dihidrotiazínico), formando as penicilinas ou cefalosporinas, respectivamente (GUIMARÃES et al., 2010).

As Proteínas Fixadoras de Penicilina (PBPs) estão presentes na membrana citoplasmática sendo alvos dos antimicrobianos β -lactâmicos (MURRAY et al., 2005). Os β -lactâmicos inibem irreversivelmente a enzima transpeptidase que catalisa a reação de transpeptidação entre as cadeias de peptideoglicanos da parede celular bacteriana (GUIMARÃES et al., 2010). A inibição de uma ou mais destas enzimas essenciais resulta em acúmulo das unidades precursoras da parede celular que por sua vez induz a ativação do sistema autolítico da célula resultando na citólise (MIMS et al., 1999). Quando a bactéria é exposta ao antibiótico, este liga-se às PBPs na membrana celular bacteriana e às enzimas autolíticas são

liberadas degradando a parede celular, ocorrendo a morte bacteriana (FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013; CHO et al., 2016).

Os carbapenêmicos, entre os β -lactâmicos, são os mais eficazes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, apresentando um amplo espectro de ação. Esses antimicrobianos têm uma estrutura molecular única, devido à presença de um carbapenem junto ao anel β -lactâmico (MELETIS, 2015). Os carbapenêmicos têm se destacado por apresentarem atividade contra bactérias resistentes. No entanto, o tratamento com carbapenêmico em monoterapia em isolados *K. pneumoniae* produtores de KPC heterorresssistentes pode levar a um alto nível de resistência e a uma falha no tratamento (ADAMS-SAPPER et al., 2015; POTTER et al., 2016).

Entre os carbapenêmicos foi visto que doripenem e meropenem apresentam uma maior estabilidade frente a hidrólise por KPC-2 em relação ao imipenem (QUEENAN et al., 2010). A associação *in vitro* e *in vivo* doripenem e amicacina em isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC já foi testada *in vitro* e *in vivo* mostrando-se eficaz (HIRSCH et al. 2012).

A taxa de falha terapêutica pode ser diminuída utilizando a associação da amicacina com carbapenêmico ou polimixina ao invés da monoterapia (LEE; GRACE; BURGESS, 2012). A associação do meropenem com a polimixina B além de apresentar um efeito sinérgico, causou alterações morfológicas mais relevantes do que quando comparado com cada antimicrobiano isoladamente frente isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase (DIEP et al., 2017) Esses estudos reforçam que a associação destas classes de antimicrobianos podem ser efetivas no tratamento de infecções por bactérias produtoras de KPC.

2.4 AMINOGLICOSÍDEOS

Os aminoglicosídeos foram descobertos em 1943, quando Waksman e colaboradores examinavam actinomicetos do solo e isolaram o *Streptomyces griseus* que elaborava uma potente substância antimicrobiana, a estreptomicina (GOODMAN; GILMAN et al., 2012). Os aminoglicosídeos formam um grupo de antimicrobianos em que os aminoaçúcares se encontram ligados por ligações glicosídicas, ou seja, possuem um grupo amino básico e uma unidade de açúcar (MINGEOT-LECLERCQ; GLUPCZYNSKI; TULKENS, 1999; GUIMARÃES et al., 2010; TORTORA et al., 2017).

Esta classe de antimicrobianos apresenta uma ação melhor em pH levemente alcalino, em torno de 7,4, onde estão positivamente carregados, facilitando a penetração em bactérias Gram-negativas (GUIMARÃES et al., 2010), os aminoglicosídeos estão entre os primeiros

antimicrobianos a apresentar atividade significativa contra bactérias Gram-negativas (RAMIREZ, TOLMASKY, 2011; TORTORA et al., 2017) e apresentam efeito sinérgico com β -lactâmicos (GUIMARÃES et al., 2010; KULENGOWSKI et al., 2019). Diferentemente da maioria dos inibidores de síntese protéica microbiana, que são bacteriostáticos, os aminoglicosídeos são bactericidas (GOODMAN; GILMAN et al., 2012; PUCCI; BUSH, 2013).

Antimicrobianos aminoglicosídicos, como a estreptomicina, a gentamicina e amicacina apresentam efeito bactericida por ligarem-se especificamente à subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, impedindo o movimento do ribossomo ao longo do mRNA e, consequentemente, interrompendo a síntese de proteínas. Dessa forma, eles atuam interferindo nas etapas iniciais da síntese proteica pela alteração conformacional da porção 30S do ribossomo 70S procariótico. Essa interferência leva à leitura incorreta do código genético impresso no mRNA (GUIMARÃES et al., 2010; TORTORA et al., 2017).

Os aminoglicosídeos podem apresentar efeitos adversos como a ototoxicidade podendo afetar a audição ao causar danos permanentes ao nervo auditivo limitando a dose utilizada e a nefrotoxicidade que é geralmente reversível (WARGO, EDWARDS, 2014; LEIS; RUTKA; GOLD, 2015). O mecanismo pelo qual os aminoglicosídeos são ototóxicos parece estar relacionado com a sua capacidade de sequestrar metais e formando complexos de quelatos que são redox ativo, podendo gerar espécies reativas a oxigênio, que por sua vez induz danos celulares. Varredores de radicais livres, bem como quelantes de ferro podem atenuar os efeitos ototóxicos de aminoglicosídeos (RAMIREZ; TOLMASKY, 2011; GOODMAN; GILMAN et al., 2012; TORTORA et al., 2017; PUCCI, BUSH, 2013).

O principal mecanismo de resistência é a modificação enzimática por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos que são divididos em acetil-transferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases (RAMIREZ; TOLMASKY, 2017). A ocorrência de mutações que afetam as proteínas ribossomais bacterianas pode conferir resistência à ação dos aminoglicosídeos. Frequentemente essa resistência pode resultar da aquisição de plasmídeos ou de genes presentes em transposons, adquiridos primariamente por conjugação e transferência de DNA, que codificam enzimas capazes de metabolizarem aminoglicosídeos, ou de um defeito no transporte do fármaco para o interior da célula bacteriana, reduzindo a eficácia clínica dos aminoglicosídeos (GOODMAN; GILMAN et al., 2012).

A amicacina, introduzida no final da década de 1970, foi e continua a ser um antibiótico essencial usado contra numerosas infecções causadas por organismos resistentes a múltiplos fármacos (RAMIREZ; TOLMASKY, 2017). Dentre os aminoglicosídeos, a amicacina possui um amplo espectro de ação, exceto contra estreptococos e bactérias anaeróbicas. A amicacina

pode ter atividade contra muitas bactérias, especialmente bacilos Gram-negativos, que são resistentes a outras drogas. A amicacina pode ser mais ativa que a gentamicina contra muitas bactérias gram-negativas, especialmente enterobactérias (MARK, 2016). Além disso, a amicacina em combinação com carbapenêmicos como o meropenem pode apresentar um efeito sinérgico, podendo participar do tratamento de infecções causadas por isolados produtores de KPC (KULENGOWSKI et al., 2019).

Um novo aminoglicosídeo, plazomicina, vem sendo testado *in vitro*, apresentando uma potente atividade frente isolados de *K. pneumoniae* MDR, até produtores de KPC, podendo representar uma alternativa promissora além da colistina, tigeciclina e polimixina; assim como para isolados resistentes à quinolonas, inibidores de β -lactamases, carbapenêmicos e aos aminoglicosídeos já usados (SHAEER et al., 2019). Em *K. pneumoniae* e em outras espécies Zda família Enterobacteriaceae, a plazomicina teve uma ação melhor do que gentamicina e amicacina, obtendo concentrações mínimas inibitórias inferiores (ARMSTRONG; MILLER, 2010; GALANI et al., 2012; DE SOUZA MENDES; DE SOUZA ANTUNES, 2013; ALMAGHRABI et al., 2014).

A resistência aos aminoglicosídeos ocorre através de mecanismos que podem coexistir simultaneamente na mesma célula (RAMIREZ; TOLMASKY, 2011; GARNEAU-TSODIKOVA, LABBY, 2016). Em bactérias Gram-negativas a resistência é devida geralmente a desativação dos aminoglicosídeos por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos que atuam em sítios específicos dos aminoglicosídeos causando acetilação via acetiltransferase aminoglicosídeo (AAC), adenilação nucleotidiltransferase aminoglicosídeo (ANT) ou fosforilação via fosfotransferase aminoglicosídeo (APH) (RAMIREZ; TOLMASKY, 2011; GAD; MOHAMED; ASHOUR, 2011; DOI et al., 2017). Outros mecanismos incluem a redução da concentração intracelular de aminoglicosídeos por alterações na permeabilidade da membrana exterior que é geralmente um mecanismo não específico de resistência, do transporte da membrana interior, de efluxo ativo ou aprisionamento da droga, a alteração da subunidade ribossomal 30S alvo por mutação, e finalmente metilação do sítio de ligação do aminoglicosídeo (RAMIREZ; TOLMASKY, 2011; WACHINO, ARAKAWA, 2012; HALDORSEN et al., 2014).

O sinergismo antimicrobiano resultante da combinação de antibióticos tem sido uma abordagem terapêutica preferida para o tratamento de infecções bacterianas graves, por possibilitar um espectro maior da atividade antibacteriana e prevenir o desenvolvimento de resistência. Dessa forma, foi observado que os aminoglicosídeos em associação com antimicrobianos que inibem a biossíntese da parede celular, tais como β -lactâmicos, contra

isolados de *E. coli* apresentaram uma atividade sinérgica bactericida (GAD; MOHAMED; ASHOUR, 2011).

Um sucesso terapêutico superior a 70% foi observado no tratamento com carbapenêmicos associados com aminoglicosídeo, polimixina associada e tigeciclina já no uso de carbapenêmico e polimixina sozinhos, o sucesso foi reduzido para 40% e 14%, respectivamente (HIRSCH; TAM, 2010). Concentrações clinicamente relevantes de imipenem associadas a um aminoglicosídeo proporcionaram um efeito sinérgico bactericida e a diminuição de resistência contra isolados clínicos resistentes a carbapenêmicos, foi sugerido que o rompimento da membrana externa por um aminoglicosídeo contribuiu para a sinergia do imipenem com um aminoglicosídeo (YADAV et al., 2009).

O uso de concentrações sub-CIMs de amicacina reduziu a formação de biofilme e interferiu na expressão de fímbria em isolados de *E. coli* (WOJNICZ; TICHACZEK-GOSKA, 2013). A amicacina apresentou eficácia para tratar um biofilme jovem de *K. pneumoniae*, sugerindo que o início precoce do tratamento com antibióticos das bactérias nem um biofilme é essencial à medida que o biofilme cresce; há aumento da produção de polissacarídeo extracelular, tornando os biofilmes mais antigos resistentes aos antibióticos (SINGLA, HARJAI, CHHIBBER, 2013).

Alguns estudos relataram a eficácia de agentes antimicrobianos, quando utilizados em combinação, apesar da resistência documentada a várias classes de antimicrobianos, a morte bacteriana ainda pode ser alcançada com combinações de antimicrobianos cuidadosamente selecionados. Esta pode ser uma alternativa para as infecções causadas por microrganismos resistentes aos carbapenêmicos (LIM et al., 2011; POURNARAS et al., 2011; DOSLER et al., 2016; WANG et al., 2017). A eficácia da associação da amicacina com outros antimicrobianos como ceftazidima, gentamicina, aztreonam, ciprofloxacina, tigeciclina e meropenem tem sido relatada *in vitro* e *in vivo* em células plânctônicas e na formação de biofilme. A associação de carbapenêmicos com amicacina têm representado uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções por bactérias produtoras de carbapenemases (BAYER; NORMAN; KIM, 1985; PEFANIS et al., 1993; FOUN; BRET, 2014; YASIN et al., 2017).

2.5 POLIMIXINAS

As polimixinas são antimicrobianos lipopeptídicos, isolados do microrganismo Gram-positivo *Paenibacillus polymyxa* na década de 1940, apresentam atividade bactericida contra bacilos Gram-negativos pela ruptura da membrana celular bacteriana através de interações

eletrostáticas e hidrofóbicas (KAYE et al., 2016; SRINIVAS; RIVARD, 2017). Entretanto, o seu uso foi praticamente abandonado entre 1970 e 1980, em virtude do aparecimento de antimicrobianos com menor toxicidade. O retorno do uso das polimixinas na última década ocorreu devido ao surgimento de bactérias Gram-negativas MDR, principalmente em pacientes internados em unidades de terapia intensiva, e a ausência de novos antimicrobianos para combater esses patógenos (MENDES; BURDMANN, 2009; POIREL; JAYOL; NORDMAN, 2017).

A ação das polimixinas ocorre nas membranas externa e citoplasmática, semelhante a detergentes catiônicos. Ligam-se a componentes da membrana externa como fosfolipídeos e lipopolissacarídeos (LPS), a molécula dapolimixina carregada positivamente interage com os grupos fosfato carregados negativamente na porção lipídica A do LPS, desestabilizando a membrana externa. Dessa forma, a molécula de polimixina é capaz de inserir suas regiões hidrofóbicas na membrana externa deslocando competitivamente os íons de Ca e Mg que agem como estabilizadores da membrana, provocando ruptura da mesma, levando à perda do conteúdo celular e ocasionando morte celular (MENDES; BURDMANN, 2009; KAYE et al., 2016; SRINIVAS; RIVARD, 2017).

Os efeitos adversos desta classe de antimicrobianos são a nefrotoxicidade (aproximando-se de 50%) e a neurotoxicidade (VELKOV et al., 2013; KAYE, 2016). Dados recentes demonstraram que a polimixina B pode ser menos nefrotóxica do que a colistina (AVEDISSIAN, 2019). Atualmente, somente a polimixina B e a colistina (polimixina E) são utilizadas na prática clínica, devido a maior toxicidade das demais (MENDES; BURDMANN, 2009; THOMAS et al., 2019). Apesar da toxicidade, a colistina e a polimixina B foram reconsideradas como última escolha para o tratamento de infecções por patógenos MDR (POIREL; JAYOL; NORDMAN, 2017).

No Brasil, a *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos é endêmica, sendo a polimixina B amplamente utilizada no tratamento de infecções causadas por esses microrganismos. No entanto, foi relatado um aumento na taxa de resistência à polimixina B entre os isolados de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos, principalmente produtores de KPC-2 (BARTOLLETTI et al., 2016). A incidência de infecções causadas por patógenos resistentes principalmente aos carbapenêmicos tem aumentado globalmente, como as polimixinas são consideradas como último recurso antibiótico para o tratamento de tais infecções, houve um aumento no uso desses antimicrobianos (THOMAS et al., 2019). Diante do aumento do uso de polimixinas nos últimos anos, os relatos de resistência também aumentaram, já que as opções terapêuticas são limitadas (SRINIVAS; RIVARD, 2017). Além

disso, a colonização por *K. pneumoniae* produtora de KPC e o uso prévio de polimixina B podem estar associados ao desenvolvimento de microrganismos resistentes à polimixina (GASPAR et al., 2015).

As infecções associadas a formação de biofilme representam um empecilho para eficácia do tratamento até mesmo com o uso das polimixinas, foi observado que *K. pneumoniae* foi suscetível à colistina em sua forma planctônica, mas apresentaram uma resistência aumentada nos biofilmes, indicando uma heterorresistência à colistina somente quando cultivada em arranjos de biofilme (SILVA et al., 2016). Por outro lado, a polimixina B foi capaz de inibir a formação de biofilme e reduzir o biofilme pré-formado de *K. pneumoniae* (HERRERA et al., 2018). A formação de biofilme por isolados clínicos de *A. baumannii* MDR foi induzida por concentrações sub-letais de colistina e polimixina B (SATO et al., 2018).

2.6 RESISTÊNCIA AOS β -LACTÂMICOS

As β -lactamases são enzimas com atividade hidrolítica, capazes de inativar uma grande variedade de antimicrobianos β -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas e os monobactâmicos (GHAFOURIAN et al., 2015). Essas enzimas degradam o anel β -lactâmico dos antimicrobianos inativando-os (TRABULSI, 2015). Anteriormente ao uso da penicilina generalizado para o tratamento de infecções bacterianas, Abraham e Chain (1940) descreveram a primeira β -lactamase (BUSH, 1989). Desde então, inúmeras β -lactamases foram identificadas e vários esquemas de classificação foram propostos para agrupar estas enzimas de acordo com suas características bioquímicas e pela análise de suas estruturas moleculares (BUSH, 1989; LIVERMORE, 1995; BUSH, 2010; LIVERMORE, 2012). As β -lactamases foram divididas de acordo com suas estruturas primárias em quatro classes (A a D). De acordo com as diferenças em seus mecanismos catalíticos, as diferentes classes podem ser classificadas dentro de dois grupos: serina- β -lactamases (classes A, C e D) e metalo- β -lactamases (classe B) (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; BERTONCHELI; HÖRNER, 2008; BUSH, 2010; LIVERMORE, 2012).

A produção de β -lactamases é o mecanismo mais comum de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos e o mais representativo em bactérias Gram-negativas, tendo apresentado, ao longo dos anos, um impacto considerável na eficácia daqueles antimicrobianos (SUBRAMANIAN et al., 2015; BUSH, 2018). No final da década de 1980, houve um aumento na incidência das bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL nas unidades de cuidados intensivos neonatais, especialmente em países em desenvolvimento. Este fato possivelmente

está relacionado à maior utilização das cefalosporinas de terceira e quarta geração, à necessidade frequente de procedimentos invasivos e à não adoção de medidas específicas de controle de infecção hospitalar (KIM et al., 2002; HERNÁNDEZ et al., 2003; BLOMBERG et al., 2005).

As bactérias que mais produzem β -lactamases relatadas na literatura são *K. pneumoniae* e *E. coli* (KIM et al., 2002; CASSETTARI et al., 2006). Em um estudo, as ESBLs foram detectadas em aproximadamente 50% dos isolados de *K. pneumoniae* 15,38% sendo sensível ao imipenem e 23,07% a tigeciclina, tertraciclina, ertapenem, piperacilina e tazobactam e amicacina (RAHIM; MOHAMED, 2014). Diante da problemática mundial da resistência bacteriana é importante definir os mecanismos moleculares de resistência, a fim de melhorar as abordagens terapêuticas diante das infecções causadas por bactérias resistentes à múltiplos antimicrobianos (PEREZ et al., 2019).

A produção de carbapenemases é um dos principais mecanismos de resistência dos isolados resistentes aos carbapenêmicos (DE CAMPOS et al., 2016; SATLIN; WALSH, 2017; YE et al., 2018). As carbapenemases são β -lactamases capazes de hidrolisar os carbapenêmcios, incluindo as enzimas das classes A, B e C de Ambler. Para a família Enterobacteriaceae, a KPC, uma carbapenemase de classe A, tem sido destacada. As enzimas do tipo KPC podem hidrolisar quase todos os β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, mas podem ser facilmente inibidos pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam (BLAIR et al., 2015; YE et al., 2018).

A detecção de KPC em isolados bacterianos no Brasil, têm sido realizada em diversas regiões do Brasil e em diferentes espécies bacterianas, indicando que ocorre uma disseminação desse mecanismo de resistência (CABRAL et al., 2015; DE CAMPOS et al., 2016; FLORES et al., 2016). A difusão de isolados de *K. pneumoniae* portadores de KPC-2 representa uma ameaça importante de cuidados de saúde, ademais foi observado que diferentes clones de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2 foram responsáveis por infecções graves em pacientes internados em um hospital brasileiro (TOLENTINO et al., 2018).

A *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos foi responsável pelo aumento de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos nos últimos vinte anos, esta espécie compreendeu 71,1% dos isolados de enterobactérias. O aumento da resistência aos carbapenêmicos nesta espécie foi estatisticamente significativo em todas as regiões e entre todos os tipos de infecção, sendo o maior aumento na América Latina (CASTANHEIRA et al., 2019). No estudo de Flores et al. (2016), ao analisar amostras de culturas de vigilância da unidade de terapia intensiva, a detecção do gene *bla_{KPC}* ocorreu em 57% dos isolados de *K.*

pneumoaniae. Diante do cenário atual de resistência bacteriana, estudos que avaliem os mecanismos de resistência em isolados bacterianos provenientes de culturas de vigilância, a fim de que medidas mais eficazes para conter esses patógenos sejam colocadas em prática, buscando evitar a disseminação dos genes de resistência no ambiente hospitalar.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença dos genes de resistência *bla*_{KPC} e de virulência *mrkA*, *mrkD*, *fimH*, *cps* e *ecpA* e a capacidade de isolados clínicos de *K. pneumoniae* formarem biofilme e a avaliar a expressão de genes relacionados à formação de biofilme e do gene de resistência *bla*_{KPC}, bem como, pesquisar alterações ultra-estruturais na formação de biofilme por isolados produtores de KPC submetidos à ação da amicacina e da polimixina B isoladamente e em associação com meropenem.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar a identificação da espécie *K. pneumoniae*;
- Detectar os genes de virulência associados à formação de biofilme (*cps*, *mrkA*, *fimH*, *mrkD*, *ecpA*) nos isolados de *K. pneumoniae* portadores ou não do gene *bla*_{KPC};
- Avaliar a capacidade de formação de biofilme pelos isolados de *K. pneumoniae*;
- Determinar a relação clonal dos isolados de *K. pneumoniae* incluídos neste estudo;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da amicacina e da polimixina B e do meropenem frente a isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC e formadores de biofilme;
- Avaliar a atividade sinérgica *in vitro* da amicacina e da polimixina B em associação com meropenem frente a isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC;
- Avaliar o efeito dos antimicrobianos isolados e em associação na formação de biofilme por isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC;
- Avaliar alterações ultra-estruturais na formação de biofilme por isolados de *K. pneumoniae* na presença dos antimicrobianos amicacina, polimixina B e meropenem separadamente e em associação (amicacina com meropenem e polimixina B com meropenem);
- Avaliar a expressão do gene de resistência *bla*_{KPC} e dos genes de virulência *mrkD*, *fimH*, *ecpA* e *luxS* na formação de biofilme por isolados de *K. pneumoniae* na presença dos antimicrobianos amicacina, polimixina B e meropenem separadamente e em associação (amicacina com meropenem e polimixina B com meropenem).

4 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

4.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Para realização deste estudo foram utilizados 40 isolados de *K. pneumoniae* MDR obtidos por demanda espontânea a partir de pacientes internados em dois hospitais públicos da cidade do Recife/PE, no período de 2012 a 2014, através de pesquisa de vigilância e de casos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). A identificação da espécie bacteriana e a determinação do perfil de susceptibilidade foram realizadas pelo sistema automatizado VITEK® 2 (BioMérieux).

4.2 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE BACTERIANA (MALDI-TOF)

A confirmação da espécie bacteriana de todos os isolados inclusos neste estudo foi realizada por espectrometria de massa. Fragmentos de colônias crescidas em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) e ágar foram transferidos diretamente do meio de cultura para os poços da placa de aço do equipamento, em duplicata. Posteriormente, adicionou-se 1 µL da solução matriz CHCA 10 mg/mL (*α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid*) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Foi utilizado 1 µL do calibrante para peptídeos de baixo peso molecular (Bruker Daltonics, Alemanha). Após secagem, a placa de aço foi introduzida no espectrômetro de massas (MALDI-TOF, Bruker Daltonics Inc., Alemanha), e as amostras identificadas pelo MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Alemanha).

4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A extração de DNA total dos isolados foi realizada utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA purification Kit* (Promega), segundo instruções do fabricante. As amostras bacterianas foram crescidas em caldo BHI por 24 horas a 37°C e 1 ml da cultura foi utilizado para realização da extração. O DNA total extraído foi reidratado com 50 µl de solução de reidratação de DNA para armazenamento a -20°C. A quantificação do DNA extraído dos isolados de *K. pneumoniae* foi realizada em equipamento Nanodrop (*Thermo Scientific*).

4.4 TIPAGEM MOLECULAR DOS ISOLADOS BACTERIANOS (ERIC-PCR)

Para tipagem molecular dos isolados bacterianos foi empregado o método da ERIC PCR utilizando os *primers*, descritos na tabela 1.

Tabela 1 - *Primers* utilizados para PCR e ERIC-PCR.

Genes	Primers	Sequências (5'-3')	Temp. ^a	Referências
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-1a	TGTCACGTGTATCGCCGTC	61 °C	(Yigit et al., 2001)
	KPC-1b	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC		
<i>mrkD</i>	<i>mrkD</i> -F	CCACCAACTATTCCCTCGAA	61 °C	(Hennequin et al., 2012)
	<i>mrkD</i> -R	ATGGAACCCACATCGACATT		
<i>mrkA</i>	<i>mrkA</i> -F	CCATGCAGCTGATACCAATG	58 °C	(Ares et al., 2017)
	<i>mrkA</i> -R	GCAGCCTGGCAGTTAGAGAC		
<i>cps</i>	<i>cps</i> -F	TCCCAATTGTGACCGAAATC	61 °C	(Hennequin and Forestier, 2007)
	<i>cps</i> -R	GCTCGCGGCACCAGCTGA		
<i>fimH</i>	<i>fimH</i> -F	GGTATTGGTGAAGATCGCGT	60 °C	Este estudo
	<i>fimH</i> -R	CCTGCATCAGACCAACAA		
<i>ecpA</i>	<i>ecpA</i> -F	ACCTCGCGTCTTATCACCAA	60 °C	(Ares et al., 2017)
	<i>ecpA</i> -R	CCGCTGATGATGGAGAAAG		
NA	ERIC-1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	36 °C	(Duan et al., 2009)
	ERIC-1	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		

^a Temperatura de anelamento dos *primers*

Fonte: elaborada pelo autor.

As reações foram preparadas com volume final de 25 µl, contendo 2,5 mM MgCl₂, 50 µM de cada dNTP, 0,3 µM de cada primer, 1 µl da amostra de DNA a 100 ng/µl e 1U de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). As amplificações foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos, cada ciclo de 1 minuto à 92 °C para desnaturação, 1 minuto à 36°C para anelamento e 8 minutos à 72°C para extensão (CABRAL *et al.*, 2012). Para visualização, os produtos de amplificação foram submetidos a corrida em gel de agarose a 1,5% corado com *SYBR Safe* (Invitrogen) em tampão TBE 0,5x por 120 minutos, sob as seguintes condições 100V, 190 mA, 150W. Como marcador de peso molecular foi utilizado o 1kb Plus DNA ladder (*Invitrogen*). Os amplicons foram visualizados sob luz ultravioleta em transluminador e fotodocumentados para análise, através da construção de um dendrograma pelo software PAST que apresentou o grau de similaridade genética entre os isolados.

4.5 DETECÇÃO DE GENES E SEQUENCIAMENTO

A presença dos genes *bla_{KPC}*, *fimH*, *mrkA*, *mrkD*, *ecpA* e *cps* foi analisada pela amplificação através da técnica de PCR em todos os isolados de *K. pneumoniae* deste estudo. As reações foram preparadas utilizando um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 20 ng/µl, 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Promega), 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (GeHealthcare), 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmol dos primers, além de 2,5 µl de tampão (10x). As amplificações foram realizadas em termociclador (Genepro, Bioer), utilizando a seguinte ciclagem: 5 minutos a 96°C para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos, cada ciclo de 1 minuto a 96°C para desnaturação, 1 minuto para anelamento dos iniciadores a temperatura específica para cada par de primer, seguido de 1 minuto a 72°C para extensão. Após os 35 ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72°C. Os primers utilizados estão listados na tabela 1.

Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corados com SYBR Safe (Invitrogen), visualizados e fotografados em transluminador. Como marcador de peso molecular foi utilizado o 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen). Para confirmação da identidade dos genes encontrados, alguns amplicons foram sequenciados. Para sequenciamento, os amplicons foram purificados utilizando o kit ExoSAP-IT®, conforme instruções do fabricante, onde 5 µl do produto da PCR foi misturado a 2 µl da enzima ExoSAP-IT e incubadas em termociclador a 37°C por 15 minutos e a 80 °C por mais 15 minutos. O sequenciamento dos produtos de PCR foi realizado com amostras de DNA fita dupla, através do método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo, pelo método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1992) no Núcleo de Plataformas Tecnológicas 1 (NPT-1) do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE. A análise das sequências de DNA e o alinhamento múltiplo foi realizado utilizando o programa DNAbaser. As sequências geradas após alinhamento foram analisadas com o auxílio do BLAST no National Center for Biotechnology Information website (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank).

4.6 FORMAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME

A triagem dos isolados capazes de formar biofilme foi realizada usando o método de formação de biofilme em microplaca com cristal violeta, através da capacidade das células aderirem à base da placa de 96 poços de poliestireno, conforme descrito anteriormente

(STEPANOVIC et al., 2007; ANBAZHAGAN et al., 2012). Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços de poliestireno (COSTAR 3599), com adição de 140 µL de caldo BHI, 20 µL de água destilada estéril e 40 µL de inóculo bacteriano ajustado e padronizado para todos os isolados a uma concentração de 10^8 UFC/mL, definido em espectrofotômetro a 600 nm, com densidade óptica (DO) entre 0.145-0.165. A placa foi incubada sem agitação a 37°C durante 24 horas. Após incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido, os poços foram lavados três vezes com 200 µL salina estéril (0.85% NaCl) e a placa contendo as células aderidas foi colocada em estufa a 60 °C por uma hora.

Os poços foram corados com 200 µL de cristal violeta 0.4% à temperatura ambiente durante 15 minutos, o corante foi então removido e os poços lavados três vezes com água corrente e secos a temperatura ambiente antes da adição de 200 µL de etanol para solubilizar o cristal violeta por 30 minutos. Em seguida, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (BioRad, modelo 550), em comprimento de onda de 570 nm. Para cada isolado, o ensaio foi realizado em poços em quadruplicata e em três ensaios independentes. Os poços contendo apenas o meio de cultura foi utilizado como controle (DOc). A análise dos isolados quanto a capacidade de formação de biofilme foi avaliada, conforme classificação anterior (STEPANOVIC et al., 2000), onde: $DO \leq DOc$ = não formador de biofilme, $DOc < DO \leq 2x DOc$ = fraco formador de biofilme, $2x DOc < DO \leq 4x DOc$ = moderado formador de biofilme e $4x DOc < DO$ = forte formador de biofilme.

4.7 SELEÇÃO DOS ISOLADOS PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E AVALIAR ATIVIDADE SINÉRGICA

Foram selecionados 10 isolados (K07, K94, K151, K483, K614, K652, K784, K870, K952, K1026) que apresentaram baixa similaridade genética entre os portadores do gene *bla_{KPC}* e formadores de biofilme para avaliar a atividade sinérgica das associações: meropenem com amicacina e meropenem com polimixina B.

4.8 DETERMINAÇÃO DA CIM

A CIM dos isolados bacterianos foi determinada frente aos antimicrobianos amicacina, polimixina B e meropenem através da técnica de macrodiluição em Caldo Mueller Hinton (CMH), o inóculo bacteriano foi comparado e ajustado à escala 0,5 de McFarland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, segundo as normas e critérios interpretativos do CLSI

(2017). As cepas de referência de *K. pneumoniae* ATCC 700603 e de *E. coli* ATCC 25922 foram utilizadas como controle de qualidade para a eficácia dos antimicrobianos.

4.9 ENSAIO DE *CHECKERBOARD*

Para avaliar o efeito sinérgico do antimicrobiano meropenem com a amicacina e com a polimixina B frente aos isolados de *K. pneumoniae* foi realizada a técnica de microdiluição modificada para o ensaio *Checkerboard*. Na microplaca de 96 poços em que o teste foi realizado foi colocado em todos os poços 100 µL de CMH, exceto na primeira coluna onde foi adicionado 200 µL solução de antimicrobiano A na concentração 2x CIM, a partir dessa primeira coluna foi realizada uma diluição seriada até a coluna oito. Em outra placa, foi realizada uma diluição seriada com a droga B. Então, 70 µL da droga B nas diferentes concentrações foram adicionados aos 100 µL da droga A em diferentes concentrações que estavam na placa do teste e acrescentado 30 µL de inóculo bacteriano ajustado à escala 0,5 de McFarland, correspondente à $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Na penúltima coluna (nº 11) foi realizado o controle de crescimento bacteriano e na última coluna (nº 12) controle negativo do CMH. As microplacas foram incubadas por 24 horas à 37°C e após esse período foi realizada a leitura visual do crescimento bacteriano.

A interpretação das interações foi realizada através do cálculo Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI) pela seguinte equação $FICI = FICA / (CIM \text{ da associação droga A e droga B} / CIM \text{ da droga A}) + FICB / (CIM \text{ da associação droga A e droga B} / CIM \text{ da droga B})$. Valores do $FICI \leq 0,5$ foram interpretados como um efeito sinérgico; $0,5 < FICI \leq 1$ um efeito aditivo, uma interação indiferente quando os valores do FICI foram < 1 e um efeito antagônico quando FICI foi maior que 2 (KUMAR et al., 2012).

4.10 SELEÇÃO DOS ISOLADOS PARA AVALIAR O EFEITO DE ANTIMICROBIANOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME E NA EXPRESSÃO DE GENES

Foram selecionados 3 isolados (K07, K94, K870), esses isolados eram resistentes ao meropenem, foram capazes de formar biofilme e ambas as associações de antimicrobianos testadas frente a eles apresentaram um efeito sinérgico.

4.11 EFEITO DOS ANTIMICROBIANOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME

Foi avaliada a formação de biofilme na presença de antimicrobianos de acordo com concentrações sinérgicas estabelecidas pela técnica de *checkerboard*. Os três isolados K07, K94 e K870 foram selecionados para avaliar o efeito de 1/2, 1/4 e 1/8 das concentrações sinérgicas encontradas para cada um dos três isolados bacterianos, que ambas as concentrações de antimicrobianos apresentaram um efeito sinérgico total. Foi utilizada a metodologia da quantificação da formação de biofilme em microplacas de 96 poços descrita por Stepanovic et al. (2000) com modificações. No CMH contendo os antimicrobianos sozinhos e em associação nas diferentes concentrações testadas foi adicionado cada isolado (K07, K94 e K870). Os grupos controles foram compostos apenas por cada isolado sem a presença dos antimicrobianos. Todos os experimentos foram realizados em duplicata biológica e triplicada técnica. Para análise de significância foi aplicado o método ANOVA e as diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA), quando um valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.12 EXTRAÇÃO DE RNA E EXPRESSÃO SE DE GENES *bla_{KPC}*, *mrkD*, *fimH*, *ecpA* e *luxS*

Os três isolados de *K. pneumoniae* foram submetidos a formação de biofilme por 24 h na presença de antimicrobianos isoladamente e em associação na 1/2 das concentrações referentes ao CIM dos antimicrobianos em combinação, ou seja, 1/2 da concentração sinérgica para cada isolado. Foi incluído um controle de cada isolado nas mesmas condições sem a presença do antibiótico. Em seguida, foi realizada a extração de RNA para posterior produção do cDNA. A extração do RNA total, foi realizada segundo protocolo descrito por Sambrook et al. (2001) com modificações.

Ao RNA extraído do biofilme foi adicionado o etanol, seguido de centrifugação, o sobrenadante descartado e o RNA aderido na parede do microtubo ressuspenso em H₂O DEPC. Posteriormente, foi realizada a purificação com DNase (Sigma Alderich) segundo normas do fabricante. O RNA tratado com DNase foi quantificado em NanoDrop e a pureza e integridade conferida em gel desnaturante de agarose 1%. A partir do RNA obtido foi realizada a síntese do cDNA para utilização nos ensaios. Para a produção do cDNA, utilizou-se Random Primers (Promega) e a enzima M-MLV RT (transcriptase reversa) (Promega), segundo instruções do fabricante. A determinação da expressão dos genes *bla_{KPC}*, *mrkD*, *fimH*, *ecpA* e *luxS* foi realizada através de RT-PCR qualitativa, utilizando os primers descritos na tabela 2. As

imagens foram fotodocumentadas e analisadas após corrida em gel de agarose 1.5% em SyberSafe (Invitrogen). Para análise da expressão, os isolados foram comparados com seus respectivos controles sem submissão aos antimicrobianos.

Tabela 2 - Sequência de *primers* utilizados nas reações de RT-PCR para detecção dos genes *bla_{KPC}*, *fimH*, *mrkD*, *luxS*, *ecpA* nos isolados de *K. pneumoniae* estudados.

Genes	Sequência de <i>primers</i> (5' → 3')	<i>Amplicons</i> (pb)	Referências
<i>luxS</i>	GGAACGCGGTATCCACAC TGAGCTCCGGGATCTGGT	226	(De Araújo et al., 2010)
<i>mrkD</i>	CCACCAACTATTCCCTCGAA ATGGAACCCACATCGACATT	226	(Hennequin et al., 2012)
<i>fimH</i>	GGTATTGGTGAAGATCGCGT CCTGCATCAGACCAACAAC	248	(Este estudo)
<i>bla_{KPC}</i>	GGCAGTCGGAGACAAAACC CCCTCGAGCGCGAGTCTA	177	(Chen et al., 2011)
<i>ecpA</i>	ACCTCGCGTCTTATCACCAA CCGCTGATGATGGAGAAAG	192	(Ares et al., 2016)

Fonte: elaborada pelo autor.

4.13 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A análise da formação de biofilme nos 3 isolados de *K. pneumoniae* (K07, K94, K870) em superfície de catéteres na presença de antimicrobianos isoladamente e em associação na 1/2 da concentração sinérgica foi realizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Após 24h de crescimento bacteriano os catéteres foram lavados em tampão fosfato 0,1M, pH, 7,4 para posterior fixação em tampão fosfato 0,1M e glutaraldeído a 2,5%. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M por 90 minutos. Em seguida foram realizadas três lavagens em tampão fosfato 0,1M para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de etanol a 30%, 50%, 70%, 90% e 3 vezes de 100% por 10 minutos cada etapa. Após a desidratação foi realizado o ponto crítico para a substituição do etanol por dióxido de carbono, obtendo-se a secagem do material para montagem do material em *stubs* metálicos utilizando uma fita dupla face de carbono. Em seguida, foi realizada a metalização cobrindo o

material por uma fina camada de ouro, para visualização da formação do biofilme no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5600 LV.

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO 1 – Submetido à Revista Acta Tropica

Identificação da formação de biofilme e genes de virulência em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* portadores e não portadores do gene *bla*_{KPC} em Pernambuco, Brasil

Introdução

As infecções causadas por isolados de *K. pneumoniae*, frequentemente, apresentam perfil fenotípico de resistência à antimicrobianos, sendo o principal mecanismo de resistência dessa espécie a produção de β -lactamases, enzimas que inativam os β -lactâmicos (Sbrana et al., 2013; Cheikh et al., 2017). Dentre as β -lactamases, a do tipo Carbapenemase *Klebsiella pneumoniae* (KPC) se destaca por conferir resistência às últimas opções de tratamento utilizando os β -lactâmicos, representando grande desafio para o sucesso terapêutico dessas infecções (Barnes et al., 2017).

A patogenicidade de isolados de *K. pneumoniae* pode ser aumentada devido à presença diferentes fatores de virulência. Dentre estes, incluem-se a produção de cápsula polissacarídica que confere proteção frente o sistema imune do paciente e a produção de fímbrias do tipo 1 e 3, as quais podem facilitar a aderência bacteriana as superfícies de tecidos específicos e as superfícies abióticas como cateteres, contribuindo para a formação de biofilme (Hennequin et al., 2012; Stahlhut et al., 2012; Madsen et al., 2016; Vuotto et al., 2017).

Biofilmes, forma de vida diferente das bactérias plânctônicas, são comunidades complexas multicelulares embebidas em uma matriz composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos. As infecções causadas por biofilmes são mais difíceis de tratar pois a difusão dos agentes antimicrobianos pode ser prejudicada, além disso, a proximidade das células favorece a comunicação celular e a transferência horizontal de genes (El Fertas-Aissani et al., 2013; Kostakioti et al., 2013; Hall and Mah, 2017). Dessa forma, a formação de biofilme pode dificultar ainda mais o tratamento de infecções causadas por bactérias multidroga-resistentes (MDR), pois os biofilmes microbianos podem ser 10-1000 vezes mais resistentes que as bactérias planctônicas e têm sido associados a uma variedade de infecções persistentes que respondem fracamente a terapia com antimicrobianos convencionais (Burmølle et al., 2008; Lebeaux et al., 2014; Delcaru et al., 2017; Di Domenico et al., 2017; Arciola et al., 2018).

A taxa de mortalidade por bactérias produtoras de KPC é superior a 40%, inclusive no Brasil (Tzouveleakis et al., 2014; Tumbarello et al., 2015; Ramos-castañeda et al., 2018), uma

alta correlação entre a produção de biofilme e resistência fenotípica a múltiplas drogas foi estabelecida, onde 80% das cepas produtoras de biofilme eram MDR (Subramanian et al., 2015). A maioria dos isolados de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla_{KPC}* é também formador de biofilme o que pode aumentar o desafio terapêutico (Diago-Navarro et al., 2014; Naparstek et al., 2014; Araújo et al., 2018).

A presença do biofilme em dispositivos invasivos faz com que esses dispositivos sejam substituídos devido a infecção, aumentando os custos para o tratamento dos pacientes acometidos por essas infecções já que o biofilme pode ser um empecilho para ação dos antimicrobianos e do sistema imunológico do paciente, além de ser responsável por disseminar resistência naquele ambiente (Piperaki et al., 2017). Devido às complicações e dificuldades terapêuticas relacionadas a produção de biofilme por isolados de clínicos de *K. pneumoniae*, este estudo teve o objetivo de determinar a capacidade de formação de biofilme e a presença de genes de virulência relacionados ao biofilme em isolados de *K. pneumoniae* portadores e não portadores do gene *bla_{KPC}*.

Materiais e métodos

Obtenção dos Isolados bacterianos

Foram analisados 40 isolados clínicos de *K. pneumoniae*. Os isolados bacterianos foram obtidos por demanda espontânea a partir de pacientes internados em dois hospitais públicos da cidade do Recife/PE, no período de 2012 a 2014, através de pesquisa de vigilância e de casos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). Os isolados bacterianos foram mantidos em estoque congelado a -20 °C no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Parasitologia/IAM-FIOCRUZ. Não foi necessário o parecer do Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, pois os isolados utilizados no presente estudo foram obtidos de ambiente hospitalar por demanda espontânea de IRAS diretamente do laboratório de microbiologia, dos hospitais fontes, sem nenhum contato com os pacientes ou prontuários médicos.

Identificação e perfil de susceptibilidade dos Isolados bacterianos

A identificação bioquímica e o perfil de susceptibilidade de todos os isolados foram realizados em sistema automatizado VITEK® 2 (BioMérieux). Para a confirmação da espécie bacteriana incluídas neste estudo foi realizada a espectrometria de massa (MALDI-TOF). Para as análises, os isolados foram reativados em caldo BHI, incubados por 24 h a 37 °C e posteriormente semeados em ágar nas mesmas condições de incubação. Fragmentos das

colônias foram transferidos diretamente do meio de cultura para os poços da placa de aço, em duplicata. Posteriormente, adicionou-se 1 µL da solução matriz CHCA 10 mg/mL (*α*-Cyano-4-hydroxycinnamic acid) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Foi utilizado 1 µL do calibrante para peptídeos de baixo peso molecular (Bruker Daltonics, Alemanha). Após secagem, a placa de aço foi introduzida no espectrômetro de massa (MALDI-TOF, Bruker Daltonics Inc., Alemanha), e as amostras identificadas através do MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Alemanha).

Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA total dos isolados foi realizado utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA purification Kit* (Promega), segundo instruções do fabricante. O DNA total extraído foi reidratado com 50 µL de solução de reidratação de DNA para posterior armazenamento a - 20 °C. A quantificação do DNA dos isolados de *K. pneumoniae* foi realizada em equipamento Nanodrop (Thermo Scientific) e posteriormente diluído a 20 ng/mL para as reações de PCR.

Tipagem molecular dos isolados bacterianos

Para tipagem molecular dos isolados bacterianos foi empregado a técnica do ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR), utilizando os primers descritos na tabela 1. As reações foram preparadas com volume final de 25 µL contendo 2.5 mM MgCl₂, 50 µM de cada dNTP, 0.3 µM de cada primer, 5 µL da amostra de DNA a 20 ng/µL e 1.5 U Taq DNA polymerase (Promega). As amplificações foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos, consistindo em cada ciclo de 1 min à 92 °C para desnaturação, 1 min à 36 °C para anelamento e 8 min à 72 °C para extensão (Cabral et al., 2012). Os *amplicons* foram corados com SyberSafe (Invitrogen) e submetidos a corrida em gel de agarose a 1.5% em tampão TBE 0,5x por 120 minutos, sob as seguintes condições 100 V, 190 mA, 150 W. Os *amplicons* foram analisados através da construção de um dendrograma pelo software *PAST* que apresentou o grau de similaridade genética entre os isolados.

Tabela 1 - Primers utilizados para PCR e ERIC-PCR. ^a Temperatura de anelamento dos primers.

Genes	Primers	Sequências (5'-3')	Temp. ^a	Referências
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-1a	TGTCACTGTATCGCCGTC	61 °C	(Yigit et al., 2001)
	KPC-1b	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC		
<i>mrkD</i>	<i>mrkD</i> -F	CCACCAACTATTCCCTCGAA	61 °C	(Hennequin et al., 2012)
	<i>mrkD</i> -R	ATGGAACCCACATCGACATT		
<i>mrkA</i>	<i>mrkA</i> -F	CCATGCAGCTGATACCAATG	58 °C	(Ares et al., 2017)
	<i>mrkA</i> -R	GCAGCCTGGCAGTTAGAGAC		
<i>cps</i>	<i>cps</i> -F	TCCCAATTGTGACCGAAATC	61 °C	(Hennequin and Forestier, 2007)
	<i>cps</i> -R	GCTCGCGGCACCAGCTGA		
<i>fimH</i>	<i>fimH</i> -F	GGTATTGGTGAAGATCGCGT	60 °C	Este estudo
	<i>fimH</i> -R	CCTGCATCAGACCAACAA		
<i>ecpA</i>	<i>ecpA</i> -F	ACCTCGCGTCTTATCACCAA	60 °C	(Ares et al., 2017)
	<i>ecpA</i> -R	CCGCTGATGATGGAGAAAG		
NA	ERIC-1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	36 °C	(Duan et al., 2009)
	ERIC-1	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		

Fonte: elaborada pelo autor.

Condições de PCR para detecção de genes de virulência *fimH*, *mrkA*, *mrkD*, *ecpA* e *cps* e gene de resistência *bla_{KPC}*

Para a detecção dos genes de resistência e virulência foi realizada a amplificação através da técnica de PCR, usando os primers descritos na Tabela 1. As reações foram preparadas utilizando um volume total de 25 µL por tubo, compreendendo: 1 µL de DNA genômico a 20 ng/µL, 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Promega), 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (GeHealthcare), 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmol dos primers, além de 2.5 µL de tampão (10x). As amplificações foram realizadas em termociclador (Genepro, Bioer). Ciclagem de 5 min à 96 °C para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos, consistindo em cada ciclo de 1 min à 96 °C para desnaturação, 1 min para anelamento dos primers, seguido de 1 min à 72 °C para extensão. Após os 35 ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 min a 72 °C.

Sequenciamento de DNA

Para confirmação da identidade dos genes *fimH*, *mrkA*, *mrkD*, *cps*, *ecpA* e *bla_{KPC}* os amplicons foram sequenciados. Para o sequenciamento, os amplicons foram purificados utilizando o kit ExoSAP-IT® (Promega) conforme instruções do fabricante. O sequenciamento dos produtos de PCR foi realizado através do método de terminação de cadeia de

desoxirribonucleotídeo (Sanger; Nicklen; Coulson, 1977). A análise das sequências de DNA e o alinhamento múltiplo foi realizado utilizando o programa DNAbaser. As sequências geradas após alinhamento foram analisadas com o auxílio do BLAST no National Center for Biotechnology Information website (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank).

Formação de biofilme

A detecção e quantificação do biofilme formado pelos isolados bacterianos foi realizada pelo método fenotípico em microplaca com modificações (Anbazhagan et al., 2012; Stepanovic et al., 2000). Os ensaios foram realizados em microplacas de poliestireno com 96 poços (CORNING®), com adição de 140 µL de caldo BHI, 20 µL de água destilada estéril e 40 µL de inóculo bacteriano ajustado e padronizado para todos os isolados a uma concentração de 10^8 UFC/mL, definido em espectrofotômetro a 600 nm. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido, os poços foram lavados três vezes com 200 µL salina estéril (0.85% NaCl) e a placa contendo as células aderidas foi colocada em estufa a 60 °C por uma hora. Os poços foram corados com 200 µL de cristal violeta 0.4% à temperatura ambiente durante 15 min, o corante foi então removido e os poços lavados três vezes com água corrente e secos a temperatura ambiente antes da adição de 200 µL de etanol para solubilizar o cristal violeta por 30 min. Em seguida, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (BioRad), em comprimento de onda de 570 nm. Para cada isolado, o ensaio foi realizado em quadruplicata técnica e triplicata biológica. Os poços contendo apenas o meio foi utilizado como controle (DOc). A análise dos isolados quanto a capacidade de formar biofilme foi avaliada, conforme classificação anterior (Stepanovic et al., 2000), onde: $DO \leq DOc$ = não formador de biofilme, $DOc < DO \leq 2x DOc$ = fraco formador de biofilme, $2x DOc < DO \leq 4x DOc$ = moderado formador de biofilme e $4x DOc < DO$ = forte formador de biofilme.

Resultados

Identificação e perfil de susceptibilidade dos Isolados bacterianos

Todos os 40 isolados identificados pelo VITEK foram confirmados no MALDI-TOF quanto a espécie *K. pneumoniae*. Na análise do perfil de susceptibilidade dos isolados bacterianos foi observado que dentre os isolados KPC positivos apenas um (n=1/5.5%) não apresentou resistência ao meropenem, todos (n=18/100%) apresentaram resistência as cefalosporinas de 3ª geração, oito (n=8/44.4%) foram resistentes a gentamicina, três

(n=3/16.6%) apresentaram resistência a amicacina e dois (n=2/11.1%) apresentaram resistência a tigeciclina, um (n=1/5.5%) apresentou resistência a colistina e todos foram sensíveis a polimixina B.

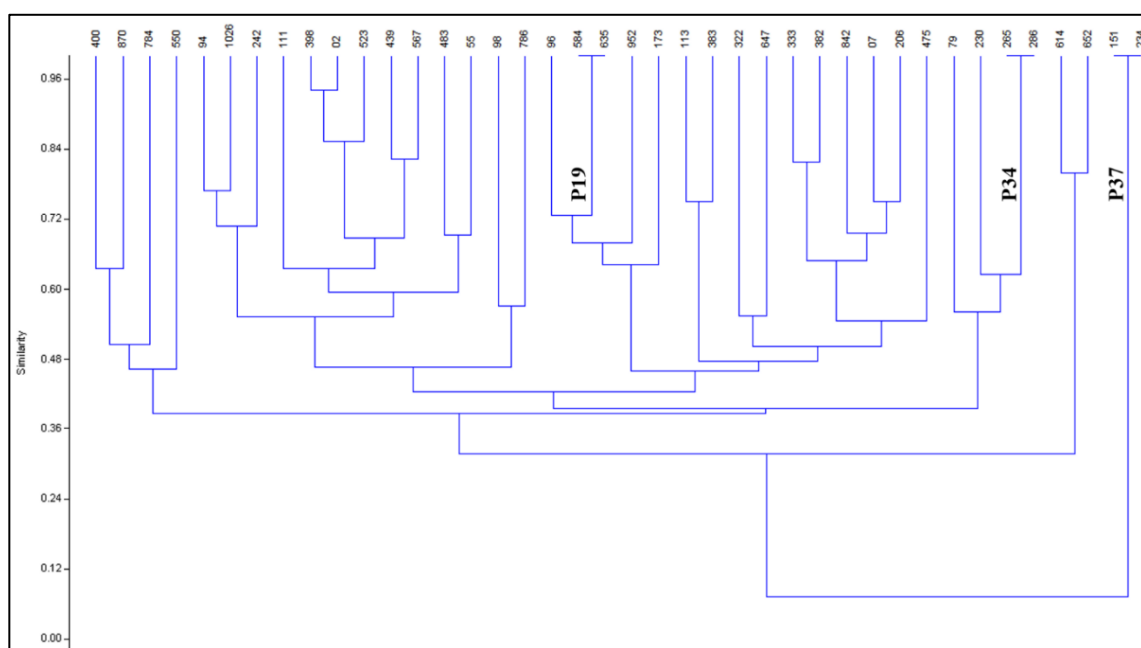
Já os isolados não produtores de KPC foi verificado que todos apresentaram fenótipo ESBL, com resistência as cefalosporinas de 3ª geração, 15 (n=15/68.2%) isolados apresentaram resistência a gentamicina, dois (n=2/9.1%) apresentaram resistência a amicacina, três (n=3/13.6%) apresentaram resistência intermediária a tigeciclina e cinco (n=5/22.7%) isolados apresentaram resistência aos carbapenêmicos apesar de não serem portadores do gene *bla*_{KPC}, todos foram sensíveis a colistina e polimixina B.

Tipagem molecular dos isolados bacterianos

Na análise através da técnica de ERIC-PCR foi possível detectar a presença de 3 clones (perfil clonal fortemente semelhantes) K151 e K234 – **P37**, K265 e K286 – **P34**, K584 e K635 – **P19**, houve uma similaridade genética de 92% entre os isolados K02 e K398, 88% entre os isolados K02, K398 e K523, 82% entre os isolados K439 e K567. Já os grupos dos isolados K96, K584 e K635; K113 e K383 apresentaram similaridade superior a 70%.

Dentre os isolados classificados como clones: os isolados K151 e K234 pertenciam, respectivamente, aos hospitais B e A. Os outros dois clones identificados foram provenientes do mesmo hospital (Fig. 1)

Figura 1. Dendograma da similaridade genética dos 40 isolados de *Klebsiella pneumoniae* gerado pelo software PAST.



Fonte: elaborada pelo autor.

Detecção do gene de resistência *bla*_{KPC} e dos genes de virulência *fimH*, *mrkA*, *mrkD*, *ecpA* e *cps*

Dos 40 isolados estudados quanto a presença dos genes, 18 possuem o gene *bla*_{KPC}, enquanto 22 isolados não possuem. Através do sequenciamento os isolados portadores de KPC foram classificados como KPC tipo 2 (*bla*_{KPC-2}).

Dentre os 18 isolados portadores do gene *bla*_{KPC-2} todos apresentaram os genes de virulência *cps*, *fimH*, *mrkA*, *mrkD* e *ecpA* com exceção do isolado K584 que apresentou os genes *cps*, *mrkA* e *ecpA* (Tab. 2). Dentre os 22 isolados não portadores do gene *bla*_{KPC-2} todos apresentaram apenas o gene de virulência *mrkA*, 21 isolados apresentaram o gene *cps* e 19 o gene *fimH*, enquanto os genes *mrkD* e *ecpA*, foram detectados em 18 e 20 isolados respectivamente (Tab. 3).

Para o sequenciamento dos produtos de PCR dos genes de virulência *fimH*, *mrkA*, *mrkD*, *ecpA* e *cps*, o isolado K151 foi selecionado por representar o maior grupo clonal e abrigar o gene *bla*_{KPC-2} e todos os cinco genes de virulência investigados.

Formação de biofilme

Pelo método fenotípico em microplaca dos 40 isolados analisados, 38 foram capazes de produzir biofilme, sendo 18 portadores e 20 não portadores do gene *bla*_{KPC-2}.

Dentre os isolados *bla*_{KPC-2} positivos 12 (66,7%) foram fortes, cinco (27,8%) moderados e um (5,5%) fraco formador de biofilme (Tab. 2).

Os 12 isolados portadores do gene *bla*_{KPC-2} positivos fortes e os cinco moderados formadores de biofilme apresentaram os genes de virulência *cps*, *fimH*, *mrkA*, *mrkD* e *ecpA*. O único isolado fraco formador de biofilme (K584) não apresentou os genes *fimH* e *mrkD*, apresentando os demais genes.

Analisando os 22 isolados *bla*_{KPC-2} negativos 19 (86,4%) foram fortes, nenhum moderado, um (4,5%) fraco formador de biofilme e dois isolados não formaram biofilme (Tab. 3). Dos 19 isolados *bla*_{KPC-2} negativos fortes formadores de biofilme, 12 apresentaram todos os genes de virulência investigados, os sete restantes apresentaram o gene *mrkA* e diferem quanto a presença dos demais genes. O único isolado fraco formador de biofilme foi o K111 só não apresentou o gene *fimH*. Dois isolados não formadores de biofilme, o K647 e K382 apresentaram os genes de virulência *cps*, *fimH*, *mrkA*, *mrkD* e *ecpA* e *cps*, *mrkA* e *ecpA*, respectivamente.

Tabela 2 - Caracterização dos Isolados de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla_{KPC}*.
Formação Biofilme: 12 isolados forte, 05 isolados moderado e 01 isolado fraco.

Isolados	Hospital	Fonte	Genes de virulência detectados	ERIC-PCR	DO	Biofilme
K02	B	Líquido peridural	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P10	0.310	Moderado
K07	B	Sangue	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P29	0.870	Forte
K94	A	Hemocultura	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P05	0.895	Forte
K151	A	Urina	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P37	0.688	Moderado
K230	B	Urina	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P33	0.914	Forte
K265	B	Urina	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P34	1.012	Forte
K286	B	STB	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P34	1.040	Forte
K398	B	Líquido cavitário	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P09	1.054	Forte
K483	A	Swab nasal	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P14	0.780	Forte
K584	B	Ponta de cateter	<i>cps, mrkA, ecpA</i>	P19	0.287	Fraco
K614	A	Swab retal	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P35	0.648	Moderado
K635	B	Urina	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P19	1.078	Forte
K652	A	Swab retal	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P36	0.830	Forte
K784	A	Swab retal	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P03	0.588	Moderado
K786	A	Aspiração hepática	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P17	0.618	Moderado
K870	A	Swab retal	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P02	0.868	Forte
K952	A	Swab nasal	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P20	1.034	Forte
K1026	A	Liquor	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P06	0.800	Forte

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 3 - Caracterização dos isolados de *K. pneumoniae* não portadores do gene *bla_{KPC}*. Formação Biofilme: 19 isolados forte, 01 isolado fraco, 2 isolados não formaram biofilme (NF).

Isolado	Hospital	Fonte	Genes de virulência detectados	ERIC-PCR	DO	Biofilme
K55	B	Urina	<i>fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P15	1.171	Forte
K79	A	Tecido	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P32	0.914	Forte
K96	B	Urina	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P18	1.061	Forte
K98	B	Urina	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P16	1.064	Forte
K111	A	Líquido peritoneal	<i>cps, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P08	0.310	Fraco
K113	B	Urina	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P22	0.890	Forte
K173	B	Urina	<i>cps, fimH, mrkA, ecpA</i>	P21	1.071	Forte
K206	B	Urina	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P30	0.922	Forte
K234	B	Urina	<i>cps, mrkA, ecpA</i>	P37	1.083	Forte
K242	B	Urina	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P07	1.081	Forte
K322	B	Urina	<i>fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P24	1.004	Forte
K333	B	Úlcera sacral	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P26	1.170	Forte
K382	B	Urina	<i>cps, mrkA, ecpA</i>	P27	NF	NF
K383	B	Urina	<i>cps, fimH, mrkA, ecpA</i>	P23	1.189	Forte
K400	B	Urina	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P01	0.922	Forte
K439	B	Urina	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA</i>	P11	1.148	Forte
K475	A	Secreção traqueal	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA</i>	P31	1.052	Forte
K523	B	Urina	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P11	0.956	Forte
K550	A	Swab nasal	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P04	1.136	Forte
K567	B	Urina	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P13	1.033	Forte
K647	B	Urina	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P25	NF	NF
K842	A	Swab nasal	<i>cps, fimH, mrkD, mrkA, ecpA</i>	P28	1.178	Forte

Fonte: elaborada pelo autor.

Discussão

A técnica MALDI-TOF permite a identificação taxonômica de microrganismos por avaliar as impressões digitais de proteínas ribossômicas de cada microrganismo, possibilitando a identificação ao nível de espécie mais precisa que sistemas automatizados como VITEK (Murray, 2012; Rahi et al., 2016; Marín et al., 2017). Todos os nossos isolados tiveram a espécie confirmada pelo MALDI-TOF.

Todos os isolados de *K. pneumoniae* neste estudo apresentaram resistência a múltiplos antimicrobianos, a maioria dos isolados foi resistente aos beta-lactâmicos, inclusive as cefalosporinas de terceira geração. A *K. pneumoniae* é um dos principais patógenos oportunistas, e está relacionada a elevados índices de mortalidade e morbidade (Peleg e Hooper,

2010). Este evento deve-se a alta capacidade que esta espécie bacteriana apresenta em desenvolver mecanismos variados de multirresistência aos antimicrobianos utilizados na prática clínica, como observado no presente estudo e que corrobora com estudos anteriores de Fair; Tor (2014), Flores et al. (2016) e Souza et al. (2017) que também descreveram perfis variados de multirresistência em isolados que *K. pneumoniae* em diferentes localidades. O perfil de multirresistência em isolados bacterianos de *K. pneumoniae* está relacionado a circulação de genes de resistência em ambientes relacionados em assistência à saúde.

Dentre os isolados KPC positivos apenas o isolado K286 foi resistente a colistina e a tigeciclina e um isolado, o K265, com resistência intermediária a tigeciclina, ambos clones, mas com o fenótipo de resistência diferente. Dos isolados KPC negativos nenhum apresentou resistência a colistina e três apresentaram resistência intermediária a tigeciclina. A resistência a colistina e tigeciclina não é comum entre os isolados de *K. pneumoniae* sendo essas opções de tratamento frente a isolados produtores de KPC, entretanto nos últimos anos tem sido observado um aumento da resistência à essas drogas, devido ao aumento do uso desses antimicrobianos para tratar infecções causadas por patógenos multidroga-resistentes (Beirão et al., 2011; Nordmann et al., 2011; Fehlberg et al., 2012; Monaco et al., 2014; Benincasa et al., 2016).

Trabalhos anteriores, relataram a resistência de *K. pneumoniae* frente a esses dois antimicrobianos (Veleba e Schneiders, 2012; Oliva et al., 2015; Cibebe et al., 2016; Singh e Gupta, 2016). Por outro lado, estudos relatam sensibilidade de isolados de *K. pneumoniae* os antimicrobianos aminoglicosídeos. Soares et al. (2012), observaram que isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC apresentaram 100% de sensibilidade a gentamicina e 62,5% de sensibilidade a amicacina. Seibert et al. (2014) demonstraram que os aminoglicosídeos apresentaram maior ação sobre isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, onde a amicacina apresentou eficiência de 91,5%, seguida da gentamicina com 57,4%. Estes dados também foram observados no presente estudo onde verificou-se valores de 83,3% e 55,5% de sensibilidade para amicacina e gentamicina, respectivamente. Dessa forma, a classe dos aminoglicosídeos, juntamente com a tigeciclina e as polimixinas continuam sendo uma boa alternativa para microrganismos resistentes aos carbapenêmicos. Entretanto, vale ressaltar que a gentamicina, amicacina e a tigeciclina não têm ação satisfatória em infecções sistêmicas graves, sendo indicada a associação com um ou mais antimicrobianos (Seibert et al., 2014).

De acordo com a Nota técnica 01 2013 da ANVISA, a terapia empírica adequada para infecções por enterobactérias multidroga-resistentes é a administração de polimixina B ou polimixina E (colistina), em associação com um ou mais antimicrobiano, como

aminoglicosídeos, carbapenêmicos e tigeciclina, evitando-se a monoterapia, devido ao risco de desenvolvimento de resistência.

Em relação a tipagem molecular, nossos resultados demonstraram a presença de clones entre os isolados, entretanto a maioria dos isolados teve uma similaridade genética menor que 70%. Um estudo de Flores et al. (2016) no Rio de Janeiro, Brasil, também foi verificado uma diversidade epidemiológica entre isolados de *K. pneumoniae*. Já nos estudos de Cabral et al. (2012) e Melo et al. (2014) realizados em Recife-PE, Brasil, também revelaram grande diversidade entre isolados de *K. pneumoniae*, apresentando similaridades de até 60% em 18 isolados analisados de onde detalhar mais

No presente estudo, três perfis de ERIC-PCR agruparam mais de um isolado bacteriano com relação clonal acima de 96% de similaridade, em que as cepas do grupo P19, P34 e P37 apresentaram diferentes perfis de resistência, confirmando assim o estudo Cabral et al. (2012), que encontraram padrões idênticos de ERIC-PCR com diferentes perfis de susceptibilidade.

No estudo de Cabral et al. (2012) foi observado 6 isolados com mesmo padrão de um mesmo hospital, indicando a disseminação num mesmo hospital. No nosso estudo, além dos dos grupos P19 e P34 que agrupavam isolados do mesmo hospital, observamos os isolados K151 e K234 que apresentaram o mesmo padrão P37 mas pertenciam a hospitais diferentes, indicando a disseminação clonal. Além disso, foi observado por Cabral et al. (2012) que isolados do mesmo grupo apresentavam perfis de susceptibilidade distintos e não apresentavam os mesmos genes de resistência, corroborando com os nossos resultados, já que os isolados K151 e K234 foram considerados clones, mas apenas um deles apresentou o gene *bla*_{KPC-2}.

No presente estudo, todos os isolados de *K. pneumoniae* apresentaram alta frequência de genes de virulência relacionados a formação do biofilme e, portanto, a maioria dos isolados foram fortes formadores de biofilme mostrando uma estreita correlação entre a presença destes genes com a formação de biofilme. No grupo KPC-positivo, observou-se que os genes de virulência *cps*, *fimH*, *mrkA*, *mrkD* e *ecpA*, tomados em conjunto, tinham uma maior frequência quando comparados aos isolados do grupo KPC-negativo. A prevalência desses genes está de acordo com outros estudos epidemiológicos. Como esperado, dado que a maioria dos isolados abrigavam todos os genes, não foi possível associação entre a presença de genes individuais e o fenótipo do biofilme.

Os biofilmes formados por *K. pneumoniae* em superfícies abióticas têm sido associados com a produção das fímbrias tipo 1 e tipo 3, codificadas pelos genes *fimH* e *mrkD*, respectivamente. Outra adesina conhecida como pilus comum de *Escherichia coli* (codificada por *ecpA*), demonstrou recentemente estar envolvida na adesão de *K. pneumoniae* e formação

de biofilme. (Struve et al., 2008; Schroll et al., 2010; Stahlhut et al., 2013; Alcántar-Curiel et al., 2013; Ostria-Hernandez et al., 2018). A cápsula um dos principais fatores de virulência, parece estar envolvida nas etapas iniciais de formação de biofilme, já foi observado que mutações em genes codificadores da CPS em *K. pneumoniae* diminuíram a biomassa do biofilme (Boddicker et al., 2006; Balestrino et al., 2014).

Dentre os 40 isolados analisados, 38 foram capazes de produzir biofilme com diferentes graus de intensidade, sendo a maioria fortes formadores. Com relação a influência da presença do gene de resistência *bla*_{KPC-2} e formação de biofilme pode-se observar que nos isolados de *K. pneumoniae* KPC negativos 84,6% dos isolados foram classificados como fortes formadores de biofilme e 9,1% não foram capazes de formar biofilme. Enquanto nos isolados KPC positivos, 66,7% foram fortes formadores de biofilme e 27,8% moderados. Desta forma, a presença do gene *bla*_{KPC-2} nos isolados não interfere diretamente na formação biofilme. No entanto, tendo em vista que o gene *bla*_{KPC-2} é responsável pela produção da *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase tipo 2 que confere resistência aos carbapenêmicos, sendo responsável pela persistência da bactéria, já que poucas opções terapêuticas são eficazes, os isolados bacterianos portadores desse gene têm uma maior a probabilidade de formação de biofilme, já que causam infecções difíceis de tratar, necessitando de um período prolongado de antibioticoterapia. Somado a isso, a presença de um maior número de genes de virulência relacionados a produção biofilme em isolados de KPC positivos, como descrito no presente estudo, potencializa a capacidade destes isolados serem fortes produtores de biofilme.

Conclusão

Nossos resultados confirmaram que todos os isolados testados de *K. pneumoniae* mostraram resistência a múltiplos antimicrobianos e alta frequência de genes de virulência relacionados à formação de biofilme. Três perfis de ERIC-PCR agruparam mais de um isolado bacteriano com uma razão clonal acima de 96% de similaridade. Entre as bactérias KPC-positivas, apenas o isolado K286 era resistente à colistina e tigeciclina, e um isolado, K265, com resistência intermediária à tigeciclina, ambos clones, mas com fenótipo de resistência diferente. Este estudo confirma a heterogeneidade genética no isolados de *K. pneumoniae* e que existe uma relação direta entre a presença do genes de virulência estudados e a formação de biofilme.

Agradecimentos

Os autores desejam expressar sinceros agradecimentos ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas/IAM/FIOCRUZ e ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA da Universidade Federal de Pernambuco. Este trabalho foi apoiado pelo programa PAPES/FIOCRUZ nº 407826/2012-2 e FACEPE-Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco. Não há conflito de interesse para qualquer um dos autores.

Referências

- Alcántar-Curiel, M.D., Blackburn, D., Saldaña, Z., Gayosso-Vázquez, C., Iovine, N., De la Cruz, M.A., Girón, J.A., 2013. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence* 4, 129–138. <https://doi.org/10.4161/viru.22974>
- Anbazhagan, D., Mansor, M., Yan, G.O.S., Md Yusof, M.Y., Hassan, H., Sekaran, S.D., 2012. Detection of quorum sensing signal molecules and identification of an autoinducer synthase gene among biofilm forming clinical isolates of *Acinetobacter* spp. *PLoS One* 7, e36696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036696>
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Nota Técnica nº 01/2013: medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. Brasília; 2013. Available from: <http://www.portal.anvisa.gov.br>
- Araújo et al., 2018. Hypervirulence and biofilm production in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil. *J. Med. Microbiol.* 67, 523–528.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Montanaro, L., 2018. Implant infections: Adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 397–409. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0019-y>
- Ares, M.A., Fernández-Vázquez, J.L., Pacheco, S., Martínez-Santos, V.I., Jarillo-Quijada, M.D., Torres, J., Alcántar-Curiel, M.D., González-Y-Merchand, J.A., De La Cruz, M.A., 2017. Additional regulatory activities of MrkH for the transcriptional expression of the *Klebsiella pneumoniae* mrk genes: Antagonist of H-NS and repressor. *PLoS One* 12, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173285>
- Balestrino, D., Charbonnel, N., Dos, M., Goncalves, S., Bernardi, T., Michaud, P., Elboutachfai, R., Wadouachi, A., Forestier, C., 2014. Anti-Biofilm Activity : A Function of *Klebsiella pneumoniae* Capsular Polysaccharide 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099995>

- Barnes et al., 2017. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2 (KPC-2), substitutions at Ambler position Asp179, and resistance to ceftazidime-avibactam: unique antibiotic-resistant phenotypes emerge from β -lactamase protein engineering. *MBio* 8, 1–17.
- Beirão, E.M., Furtado, J.J.D., Girardello, R., Ferreira Filho, H., Gales, A.C., n.d. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 15, 69–73.
- Benincasa, M., Lagatolla, C., Dolzani, L., Milan, A., Pacor, S., Liut, G., Tossi, A., Cescutti, P., Rizzo, R., 2016. Biofilms from *Klebsiella pneumoniae*: Matrix Polysaccharide Structure and Interactions with Antimicrobial Peptides. *Microorganisms* 4, 26. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4030026>
- Boddicker, J.D., Anderson, R. a, Jagnow, J., Clegg, S., 2006. Signature-tagged mutagenesis of to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. *Infect. Immun.* 74, 4590–7. <https://doi.org/10.1128/IAI.00129-06>
- Burmølle, M., Bahl, M.I., Jensen, L.B., Sørensen, S.J., Hansen, L.H., 2008. Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in Enterobacteriaceae strains. *Microbiology* 154, 187–95. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/010454-0>
- Cabral, A.B., Cássia, R. De, Melo, D.A., Amélia, M., Maciel, V., 2012. Major Article among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife , Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45, 572–578.
- Cheikh, A., Belefquih, B., Chajai, Y., Cheikhaoui, Y., El Hassani, A., Benouda, A., 2017. Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) colonization as a risk factor for developing ESBL infections in pediatric cardiac surgery patients: “retrospective cohort study.” *BMC Infect. Dis.* 17, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2346-4>
- Cibele, M.A. da S.B., Rodrigo, S. do N., Renata, C.C. e Silva, A., Jos eacute, M.A., Ana, P.S.A. da S., Alexandre, G. da S., Vera, L. uacute cia de M.L., Josean, F.T., Lu iacute s, C. aacute udio N. da S., M aacute rcia, V. da S., Maria, T. dos S.C., 2016. Syagrus coronata seed oils have antimicrobial action against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Plants Res.* 10, 310–317. <https://doi.org/10.5897/JMPR2016.6098>
- Delcaru, C., Podgoreanu, P., Alexandru, I., Popescu, N., Măruțescu, L., Bleotu, C., Mogoșanu, G., Chifiriuc, M., Gluck, M., Lazăr, V., 2017. Antibiotic Resistance and Virulence Phenotypes of Recent Bacterial Strains Isolated from Urinary Tract Infections in Elderly Patients with Prostatic Disease. *Pathogens* 6, 22.

<https://doi.org/10.3390/pathogens6020022>

- Di Domenico, E.G., Farulla, I., Prignano, G., Gallo, M.T., Vespaziani, M., Cavallo, I., Sperduti, I., Pontone, M., Bordignon, V., Cilli, L., De Santis, A., Di Salvo, F., Pimpinelli, F., La Parola, I.L., Toma, L., Ensoli, F., 2017. Biofilm is a major virulence determinant in bacterial colonization of chronic skin ulcers independently from the multidrug resistant phenotype. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18051077>
- Diago-Navarro, E., Chen, L., Passet, V., Burack, S., Ulacia-Hernando, A., Kodiyanplakkal, R.P., Levi, M.H., Brisse, S., Kreiswirth, B.N., Fries, B.C., 2014. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* exhibit variability in capsular polysaccharide and capsule associated virulence traits. *J. Infect. Dis.* 210, 803–813. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu157>
- Duan, H., Chai, T., Liu, J., Zhang, X., Qi, C., Gao, J., Wang, Y., Cai, Y., Miao, Z., Yao, M., Schlenker, G., 2009. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environ. Res.* 109, 511–7. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.02.014>
- El Fertas-Aissani, R., Messai, Y., Alouache, S., Bakour, R., 2013. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathol. Biol.* 61, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2012.10.004>
- Fair, R.J., Tor, Y., 2014. Perspectives in Medicinal Chemistry Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect. Medicin. Chem.* 25–64. <https://doi.org/10.4137/PMC.S14459.Received>
- Fehlberg, L.C.C., Carvalho, A.M.C., Campana, E.H., Gontijo-Filho, P.P., Gales, A.C., 2012. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. *Brazilian J. Infect. Dis.* 16, 577–580. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.07.001>
- Flores, C., Romão, C.M.C.P.A., Bianco, K., Miranda, C.C. de, Breves, A., Souza, A.P.S., Santos, R.M.R., Fonseca, B.O., Filippis, I. de, Clementino, M.M., 2016. Detection of antimicrobial resistance genes in betalactamase- and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* by patient surveillance cultures at an intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 52, 284–292. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20160049>
- Hall, C.W., Mah, T.F., 2017. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 276–301.

- <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>
- Hennequin, C., Aumeran, C., Robin, F., Traore, O., Forestier, C., 2012. Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. J. Antimicrob. Chemother. 67, 2123–30. <https://doi.org/10.1093/jac/dks169>
- Hennequin, C., Forestier, C., 2007. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. Res. Microbiol. 158, 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.02.005>
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S.J., 2013a. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 3, a010306–a010306. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010306>
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., Beloin, C., 2014. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 78, 510–543. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14>
- Madsen, J.S., Riber, L., Kot, W., Basfeld, A., Burmølle, M., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., 2016. Type 3 fimbriae encoded on plasmids are expressed from a unique promoter without affecting host motility, facilitating an exceptional phenotype that enhances conjugal plasmid transfer. PLoS One 11, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162390>
- Marín, M., Arroyo, R., Espinosa-Martos, I., Fernández, L., Rodríguez, J.M., 2017. Identification of emerging human mastitis pathogens by MALDI-TOF and assessment of their antibiotic resistance patterns. Front. Microbiol. 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01258>
- Melo, R. C. A., de Barros, E.M.R., Loureiro, N.G., de Melo, H.R.L., Maciel, M.A.V., Souza Lopes, A.C., 2014. Presence of *fimH*, *mrkD*, and *irp2* Virulence Genes in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Recife-PE, Brazil. Curr. Microbiol. 69, 824–831. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0662-0>
- Monaco, M., Giani, T., Raffone, M., Arena, F., Pollini, S., Euscape-italy, N., Grundmann, H., 2014. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. Eurosurveillance 19, 14–18. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.42.20939>
- Murray, P.R., 2012. What Is new in clinical microbiologymicrobial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: A paper from the 2011 William Beaumont Hospital symposium on molecular pathology. J. Mol. Diagnostics 14, 419–423.

- <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2012.03.007>
- Naparstek, L., Carmeli, Y., Navon-Venezia, S., Banin, E., 2014. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother. 1–8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt487>
- Nordmann, P., Picazo, J.J., Mutters, R., Korten, V., Quintana, A., Laeuffer, J.M., Seak, J.C.H., Flamm, R.K., Morrissey, I., 2011. Comparative activity of carbapenem testing: the COMPACT study. J. Antimicrob. Chemother. 66, 1070–8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr056>
- Oliva, A., Mascellino, M.T., Cipolla, A., D’Abramo, A., De Rosa, A., Savinelli, S., Ciardi, M.R., Mastroianni, C.M., Vullo, V., 2015. Therapeutic strategy for pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* severe infections: short-course treatment with colistin increases the in vivo and in vitro activity of double carbapenem regimen. Int. J. Infect. Dis. 33, 132–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.01.011>
- Ostria-Hernandez, M.L., Juárez-de la Rosa, K.C., Arzate-Barbosa, P., Lara-Hernández, A., Sakai, F., Ibarra, J.A., Castro-Escarpulli, G., Vidal, J.E., 2018. Nosocomial, Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Mexico City Produce Robust Biofilms on Abiotic Surfaces but Not on Human Lung Cells. Microb. Drug Resist. 24, 422–433. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0073>
- Peleg, A.Y., Hooper, D.C., 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. N. Engl. J. Med. 362, 1804–13. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0904124>
- Piperaki, E.T., Syrogiannopoulos, G.A., Tzouvelekis, L.S., Daikos, G.L., 2017. *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. Pediatr. Infect. Dis. J. 36, 1002–1005. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001675>
- Rahi, P., Prakash, O., Shouche, Y.S., 2016. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) based microbial identifications: Challenges and scopes for microbial ecologists. Front. Microbiol. 7, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01359>
- Ramos-castañeda, J.A., Ruano-ravina, A., Barbosa-lorenzo, R., Paillier, J.E., Saldaña-campos, J.C., Salinas, D.F., Lemos-luengas, E. V, Plumx, M., 2018. Mortality due to KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: Systematic review and meta-analysis. J. Infect. 76, 438–448.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Biotechnology, v. 24, p.104-108, 1992.

- Sbrana, F., Malacarne, P., Viaggi, B., Costanzo, S., Leonetti, P., Leonildi, A., Casini, B., Tascini, C., Menichetti, F., 2013. Carbapenem-sparing antibiotic regimens for infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in intensive care unit. Clin. Infect. Dis. 56, 697–700. <https://doi.org/10.1093/cid/cis969>
- Schroll, C., Barken, K.B., Krogfelt, K. a, Struve, C., 2010. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. BMC Microbiol. 10, 179. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-179>
- Seibert, G., Hörner, R., Meneghetti, B.H., Righi, R.A., Forno, N.L.F.D., Salla, A., 2014. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. Einstein (São Paulo) 12, 282–286. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082014AO3131>
- Singh, S.K., Gupta, M., 2016. blaOXA-48 carrying clonal colistin resistant-carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in neonate intensive care unit, India. Microb. Pathog. 100, 75–77. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.09.009>
- Soares, V.M., 2012. Emergência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em um hospital terciário. J. Bras. Patol. e Med. Lab. 48, 251–253. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442012000400003>
- Stahlhut, S.G., Chattopadhyay, S., Kisiela, D.I., Hvidtfeldt, K., Clegg, S., Struve, C., Sokurenko, E. V., Krogfelt, K.A., 2013. Structural and population characterization of *MrkD*, the adhesive subunit of type 3 fimbriae. J. Bacteriol. 195, 5602–5613. <https://doi.org/10.1128/JB.00753-13>
- Stahlhut, S.G., Struve, C., Krogfelt, K. a, Reisner, A., 2012. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 65, 350–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00965.x>
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M., 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J. Microbiol. Methods 40, 175–9.
- Struve, C., Bojer, M., Krogfelt, K.A., 2008. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. Infect. Immun. 76, 4055–65. <https://doi.org/10.1128/IAI.00494-08>
- Subramanian, P., Umadevi, S., Kumar, S., Stephen, S., 2015. Original Article Determination of correlation between biofilm and extended spectrum β lactamases producers of Enterobacteriaceae 2, 2–6. <https://doi.org/10.4103/2249-5975.119797>
- Tumbarello, M., Trecarichi, E.M., De Rosa, F.G., Giannella, M., Giacobbe, D.R., Bassetti, M.,

- Losito, A.R., Bartoletti, M., Del Bono, V., Corcione, S., Maiuro, G., Tedeschi, S., Celani, L., Cardellino, C.S., Spanu, T., Marchese, A., Ambretti, S., Cauda, R., Viscoli, C., Viale, P., 2015. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: Differences in therapy and mortality in a multicentre study. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 2133–2143. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv086>
- Tzouvelekis, L.S., Markogiannakis, A., Piperaki, E., Souli, M., Daikos, G.L., 2014. Treating infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 862–872. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12697>
- Veleba, M., Schneiders, T., 2012. Tigecycline resistance can occur independently of the ramA gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 4466–4467. <https://doi.org/10.1128/AAC.06224-11>
- Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M.P., Libori, M.F., Tiracchia, V., Salvia, A., Varaldo, P.E., 2017. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J. Appl. Microbiol.* 123, 1003–1018. <https://doi.org/10.1111/jam.13533>
- Yigit, H., Queenan, A.M., Anderson, G.J., Domenech-sanchez, A., Biddle, J.W., Christine, D., Alberti, S., Bush, K., Fred, C., Steward, C.D., Tenover, F.C., 2001. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase , KPC-1 , from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1151–1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151>

5.2 ARTIGO 2 - Submetido à Revista Micron

Impacto de concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos sobre o biofilme de *Klebsiella pneumoniae*: efeito na formação, ultraestrutura, expressão do *bla*_{KPC} e genes relacionados ao biofilme

Introdução

Nas últimas duas décadas, *K. pneumoniae* tornou-se um importante patógeno associado à assistência à saúde, causando aproximadamente 14 a 20% das infecções relacionadas ao trato urinário, trato respiratório, ducto biliar inferior e feridas cirúrgicas (Rosa et al., 2014). Estas infecções têm um risco elevado na presença de dispositivos médicos, como aparelhos de ventilação mecânica, cateteres e próteses, os quais são comumente contaminados por microrganismos que compõem a flora natural em torno do local onde o dispositivo foi inserido (Stewart, 2002; Singhai et al., 2012).

Fatores de virulência presentes em *K. pneumoniae*, especialmente fímbrias, cápsula polissacarídica (CPS), LPS, transportadores de membrana e sideróforos são responsáveis pela sobrevivência desta espécie e pela evasão do sistema imune do paciente durante o processo infeccioso (Costerton, 2005; Clegg and Murphy, 2016). Alguns dos genes de virulência detectados em *K. pneumoniae* também estão relacionados a produção de biofilme, como o cluster gênico *cps* (cápsula) (Balestrino et al., 2008), genes *fimH* (fímbrias tipo 1), *mrk* (fímbrias tipo 3) (Alcántar-Curiel et al., 2013), e *luxS* (sistema regulador de detecção de quorum tipo 2) que promove a comunicação célula-célula (Balestrino et al., 2005), e contribuem para a formação e desenvolvimento do biofilme de *K. pneumoniae* (Vuotto et al., 2017).

As populações bacterianas dos biofilmes são consideravelmente mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que as células planctônicas de vida livre (Anderl et al., 2001; Ghafourian et al., 2015). Por este motivo, o tratamento de infecção após o estabelecimento do biofilme é frequentemente falho com as atuais opções terapêuticas (Costerton et al., 2011). A capacidade de formar biofilme por *K. pneumoniae* protege este patógeno, não somente das respostas imunes do hospedeiro, mas também da ação dos antimicrobianos (Jagnow; Clegg, 2003; Bandeira et al., 2014), contribuindo para sua persistência no tecido epitelial e em superfícies de dispositivos médicos (Vuotto et al., 2017).

O alto potencial das bactérias que formam biofilmes causar tanto infecções relacionadas ao uso de dispositivos médicos invasivos, quanto não relacionadas ao uso de dispositivo, é preocupante para saúde pública mundial (Jamal et al., 2018). Entre as infecções microbianas e

crônicas, 65% e 80%, respectivamente, estão associadas à formação de biofilme (Lewis, 2001; Trautner; Darouiche, 2004), sendo este mecanismo de virulência responsável, na maioria das vezes, por reduzir a vida útil de dispositivos médicos invasivos (Ahemd et al., 2015).

A formação de biofilme em isolados resistentes de *K. pneumoniae* foi avaliada por Hennequin et al. (2012), onde estes autores observaram que na presença de sub-MICs de ofloxacina, a biomassa diminuiu de maneira inversamente proporcional às concentrações de antibióticos, já as concentrações de cefotaxima sub-MIC resultaram em aumento da formação de biofilme. Ao avaliar o efeito da amicacina e da ciprofloxacina em biofilmes jovens e mais velhos, nas maiores concentrações séricas atingíveis observou-se que a amicacina foi capaz de erradicar os biofilmes jovens, mas foi ineficaz em biofilmes maduros (Singla et al., 2013).

Um estudo realizado na Argélia, onde foi investigada a resposta de *K. pneumoniae*, isoladas de biofilme em dispositivos médicos, contra gentamicina, cefotaxima e ciprofloxacina, detectaram que os isolados eram pelo menos 10 a 25 vezes mais resistentes quando cultivados como biofilme do que na forma planctônica (Bellifa et al., 2013). Foi observado que concentrações sub-inibitórias de cefotaxima induziram a formação de biofilme e promoveram alterações morfológicas em isolados de *Salmonella typhi* (Narasanna et al., 2017) Esses estudos evidenciam que as bactérias em um biofilme podem responder de diferentes maneiras a um antimicrobiano, dependendo da concentração e do sítio de ação do antimicrobiano.

É recomendado o uso de antimicrobianos em combinação no caso de cepas resistentes aos carbapenêmicos, entretanto pouco se conhece sobre a ação combinada de antimicrobianos em biofilmes. Dessa forma, neste estudo, foi investigada a ação de sub-CIMS dos antimicrobianos (meropenem, amicacina e polimixina B) individual e em combinações na formação de biofilme de *K. pneumoniae*, as alterações ultra-estruturais dos biofilmes tratados e a expressão do gene de resistência *bla_{KPC}* e dos genes de virulência *luxS*, *mrkD*, *fimH* e *ecpA* em biofilmes formados na presença dos antimicrobianos.

Materiais e métodos

Obtenção dos Isolados bacterianos

No presente estudo foram utilizados 10 isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtores de *bla_{KPC}* e capazes de formar biofilmes. Os isolados bacterianos foram obtidos a partir de pacientes internados em dois hospitais públicos da cidade do Recife/PE, no período de 2012 a 2014, através de pesquisa de vigilância e de casos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS).

Formação e quantificação de biofilme

A detecção e quantificação do biofilme formado pelos isolados bacterianos foi realizada pelo método fenotípico em microplaca com modificações (Stepanovic et al., 2007; Anbazhagan et al., 2012). Os ensaios foram realizados em microplacas de poliestireno com 96 poços (CORNING®), com adição de 140 µL de Caldo Mueller-Hinton (CMH), 20 µL de água destilada estéril e 40 µL de inóculo bacteriano ajustado e padronizado para todos os isolados a uma concentração de 10^8 UFC/mL, definido em espectrofotômetro a 600 nm. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido, os poços foram lavados três vezes com 200 µL salina estéril (0.85% NaCl) e a placa contendo as células aderidas foi colocada em estufa a 60 °C por uma hora. Os poços foram corados com 200 µL de cristal violeta 0.4% à temperatura ambiente durante 15 min, o corante foi então removido e os poços lavados três vezes com água corrente e secos a temperatura ambiente antes da adição de 200 µL de etanol para solubilizar o cristal violeta por 30 min. Em seguida, realizou-se a leitura da densidade óptica (DO) a em espectrofotômetro (BioRad), em comprimento de onda de 570 nm. Para cada isolado, o ensaio foi realizado em quadruplicata técnica e triplicata biológica. A leitura da absorbância dos poços contendo apenas o meio de cultura foi utilizado como controle (DOc). A análise dos isolados quanto a capacidade de formar biofilme foi avaliada, comparando a DO com a DOc, conforme classificação anterior (Stepanovic et al., 2000), onde: $DO \leq DOc$ = não formador de biofilme, $DOc < DO \leq 2x DOc$ = fraco formador de biofilme, $2x DOc < DO \leq 4x DOc$ = moderado formador de biofilme e $4x DOc < DO$ = forte formador de biofilme.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM dos isolados bacterianos foi determinada frente aos antimicrobianos meropenem, amicacina e polimixina B através da técnica de macrodiluição em CMH, o inóculo bacteriano foi comparado e ajustado à escala 0.5 de McFarland, correspondente a 1.5×10^8 UFC/mL, segundo as normas e critérios interpretativos do CLSI (2017). As cepas de referência de *K. pneumoniae* ATCC 700603 e de *Escherichia coli* ATCC 25922 foram utilizadas como controle de qualidade para a eficácia dos antimicrobianos.

Ensaio de *Checkerboard*

Para avaliar o efeito sinérgico do antimicrobiano meropenem com a amicacina e meropenem com a polimixina B frente aos isolados de *K. pneumoniae* foi realizada a técnica de microdiluição modificada para o ensaio *Checkerboard*. Na microplaca de 96 poços em que o teste foi realizado foi colocado em todos os poços 100 µL de CMH, exceto na primeira coluna que foi adicionado 200 µL solução de antimicrobiano A na concentração 2 x CIM a partir dessa primeira coluna foi realizada uma diluição seriada até a coluna oito. Em outra placa, foi realizada uma diluição seriada com a droga B a partir da concentração de 2 x CIM, então 70 µL da droga B nas diferentes concentrações foram adicionados aos 100 µL da droga A em diferentes concentrações que estavam na placa do teste e acrescentado em todos os poços, exceto na última coluna (nº 12), 30 µL de inóculo bacteriano ajustado à escala 0.5 de McFarland, correspondente a 1.5×10^8 UFC/mL. Na penúltima coluna (nº 11) foi realizado o controle de crescimento bacteriano e na última coluna (nº 12) controle negativo do CMH. As microplacas foram incubadas por 24 h à 37 °C e após esse período foi realizada a leitura visual do crescimento bacteriano.

A interpretação das interações foi realizada através do cálculo Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) pela seguinte equação $ICIF = ICIF A (CIM \text{ da associação droga A e droga B} / CIM \text{ da droga A}) + ICIF B (MIC \text{ da associação droga A e droga B} / MIC \text{ da droga B})$. Valores do $ICIF \leq 0.5$ foram interpretados como um efeito sinérgico; $0.5 < ICIF \leq 1$ um efeito aditivo, uma interação indiferente quando os valores do ICIF foram > 1 e um efeito antagônico quando ICIF foi maior que 2 (Kumar et al., 2012).

Efeito dos antimicrobianos na formação de biofilme

Foi avaliada a formação de biofilme na presença de antimicrobianos de acordo com concentrações sinérgicas estabelecidas pela técnica de *checkerboard*. Três isolados (K07, K94, K870) foram selecionados para avaliar o efeito de 1/2, 1/4 e 1/8 das concentrações sinérgicas encontradas para cada um dos três isolados bacterianos, frente os quais ambas as concentrações de antimicrobianos apresentaram um efeito sinérgico total. Foi utilizada a metodologia da quantificação da formação de biofilme em microplacas de 96 poços descrita por Stepanovic et al. (2000) com modificações. No CMH contendo os antimicrobianos sozinhos e em associação nas diferentes concentrações testadas foi adicionado cada isolado (K07, K94 e K870). Os grupos controles foram compostos apenas por cada isolado sem a presença dos antimicrobianos.

Extração de RNA e expressão se de genes *bla_{KPC}*, *mrkD*, *fimH*, *ecpA* e *luxS*

Os três isolados (K07, K94, K870) de *K. pneumoniae* foram submetidos a formação de biofilme por 24 h na presença de antimicrobianos isoladamente e em associação na 1/2 das concentrações referentes ao CIM dos antimicrobianos em combinação, ou seja, 1/2 da concentração sinérgica para cada isolado. Foi incluído um controle de cada isolado nas mesmas condições sem a presença do antibiótico. Em seguida, foi realizada a extração de RNA para posterior produção do cDNA. A extração do RNA total, foi realizada segundo protocolo descrito por Sambrook et al. (2001) com modificações.

Ao RNA extraído do biofilme foi adicionado o etanol, seguido de centrifugação, o sobrenadante descartado e o RNA aderido na parede do microtubo ressuspensão em H₂O DEPC. Posteriormente, foi realizada a purificação com DNase (Sigma Alderich) segundo normas do fabricante. O RNA tratado com DNase foi quantificado em NanoDrop e a pureza e integridade conferida em gel desnaturante de agarose 1%. A partir do RNA obtido foi realizada a síntese do cDNA para utilização nos ensaios. Para a produção do cDNA, utilizou-se Random Primers (Promega) e a enzima M-MLV RT (transcriptase reversa) (Promega), segundo instruções do fabricante. A determinação da expressão dos genes *bla_{KPC}*, *mrkD*, *fimH*, *ecpA* e *luxS* foi realizada através de RT-PCR qualitativa, utilizando os primers descritos na tabela 1. As imagens foram fotodocumentadas e analisadas após corrida em gel de agarose 1.5% em SyberSafe (Invitrogen). Para análise da expressão, os isolados foram comparados com seus respectivos controles sem submissão aos antimicrobianos.

Tabela 1 - Sequência de *primers* utilizados nas reações de RT-PCR para detecção dos genes *bla_{KPC}*, *fimH*, *mrkD*, *luxS*, *ecpA* nos isolados de *K. pneumoniae* estudados.

Genes	Sequência de <i>primers</i> (5'→3')	Amplicons (pb)	Referências
<i>luxS</i>	GGAACGCGGTATCCACAC TGAGCTCCGGGATCTGGT	226	(De Araújo et al., 2010)
<i>mrkD</i>	CCACCAACTATTCCCTCGAA ATGGAACCCACATCGACATT	226	(Hennequin et al., 2012)
<i>fimH</i>	GGTATTGGTGAAGATCGCGT CCTGCATCAGACCAACAAC	248	(Este estudo)
<i>bla_{KPC}</i>	GGCAGTCGGAGACAAAACC CCCTCGAGCGCGAGTCTA	177	(Chen et al., 2011)
<i>ecpA</i>	ACCTCGCGTCTTATCACCAA CCGCTGATGATGGAGAAAG	192	(Ares et al., 2016)

Fonte: elaborada pelo autor.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise da formação de biofilme pelos isolados K07, K94, K870 de *K. pneumoniae* em superfície de cateteres na presença 1/2 da concentração sinérgica dos antimicrobianos isoladamente e em associação foi utilizada a técnica de MEV. Após 24h de crescimento bacteriano os cateteres foram lavados em tampão fosfato 0.1 M, pH, 7.4 para posterior fixação em tampão fosfato 0.1 M e glutaraldeído a 2.5%. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0.1M por 1 h. Em seguida, foram realizadas três lavagens em tampão fosfato 0.1 M para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de etanol a 30, 50, 70, 90 e 3 vezes 100%, por 10 min cada etapa. Após a desidratação foi realizado o ponto crítico para a substituição do etanol por dióxido de carbono, obtendo-se a secagem do material para montagem do material em suportes metálicos utilizando uma fita dupla face de carbono. Em seguida, as amostras foram metalizadas por uma fina camada de ouro e observadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5600 LV.

Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em duplicata biológica e triplicada técnica. Para análise de significância foi aplicado o método ANOVA e as diferenças estatísticas foram

determinadas pelo teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA), quando um valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Formação de biofilme

Os dez isolados analisados neste estudo foram capazes de formar biofilme, sendo três classificados como moderados formadores de biofilme e os demais fortes formadores de biofilme (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação dos isolados de *K. pneumoniae* quanto a capacidade de formação de biofilme pelo método fenotípico em microplaca.

Isolados	Biofilme
K07	Forte
K94	Forte
K151	Moderado
K483	Forte
K614	Moderado
K652	Forte
K784	Moderado
K870	Forte
K952	Forte
K1026	Forte

Fonte: elaborada pelo autor.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Dos dez isolados analisados, todos foram sensíveis a amicacina e polimixina B, com $CIM \leq 32 \mu\text{g/mL}$ e $CIM \leq 4 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Apenas o isolado 952 foi sensível ao meropenem, com $CIM < 4 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados de *K. pneumoniae* frente ao meropenem, amicacina e polimixina B.

Isolados	CIM (µg/mL)		
	Meropenem	Amicacina	Polimixina B
K07	8	2	2
K94	4	8	1
K151	8	8	1
K483	16	8	2
K614	256	8	2
K652	256	2	1
K784	128	1	0.5
K870	8	4	2
K952	1	0.5	1
K1026	4	4	1

Fonte: elaborada pelo autor.

Ensaio de *Checkerboard*

A partir dos resultados das CIM, foi avaliado o efeito sinérgico das combinações de meropenem com amicacina e meropenem com polimixina B para os 10 isolados pelo ensaio *Checkerboard*. Os resultados expressos pelo ICIF mostraram um efeito predominantemente sinérgico ($\text{ICIF} \leq 0.5$) ou aditivo ($\text{ICIF} \leq 0.75$) nas combinações avaliadas (Tabela 4). Na combinação meropenem/amicacina predominou o efeito aditivo com 60% (6/10), enquanto na combinação meropenem com polimixina predominou o efeito sinérgico com 90% (9/10).

Tabela 4 - Efeito sinérgico do meropenem com amicacina e do meropenem com a polimixina B frente isolados de *K. pneumoniae*.

Isolados	ICIF (MERO+ AMK)	Efeito	ICIF (MERO + POL)	Efeito
K07	0.5	S	0.5	S
K94	0.375	S	0.5	S
K151	0.56	A	0.31	S
K483	0.56	A	0.5	S
K614	0.625	A	0.25	S
K652	0.56	A	0.56	A
K784	0.75	A	0.25	S
K870	0.375	S	0.375	S
K952	0.28	S	0.31	S
K1026	0.53	A	0.156	S

ICIF: índice de concentração inibitória fracionada; MERO: meropenem; AMK: amicacina; POL: polimixina B;

S: efeito sinérgico; A: efeito aditivo.

Fonte: elaborada pelo autor.

Efeitos de concentrações sub-inibitórias dos antimicrobianos na formação de biofilme por *Klebsiella pneumoniae*

Os isolados resistentes ao meropenem e em que ambas as combinações de antimicrobianos causaram efeito sinérgico foram selecionados para avaliação do efeito da ação de concentrações sub-inibitórias dos antimicrobianos isolados e em associação. Os três isolados analisados foram capazes de formar biofilme na presença de concentrações sub-inibitórias dos antimicrobianos em ambas situações. Foi possível observar um comportamento diferente na formação de biofilme para cada isolado a depender da concentração e do antimicrobiano, estes resultados estão representados nas figuras 1, 2 e 3.

Para o isolado K07, não foi observada alteração significativa na formação de biofilme quando na presença dos antimicrobianos sozinhos ou em combinação nas concentrações testadas (Fig. 1A-B).

Para o isolado K94, quando submetido à amicacina nas concentrações de 0.12 µg/mL (1/4 CIM da associação) e 0.06 µg/mL (1/8 CIM da associação), polimixina B sozinha e a associação de meropenem com polimixina B nas concentrações referentes à 1/2 e 1/4 CIM da associação, não apresentaram diferença significativa na formação de biofilme em relação ao

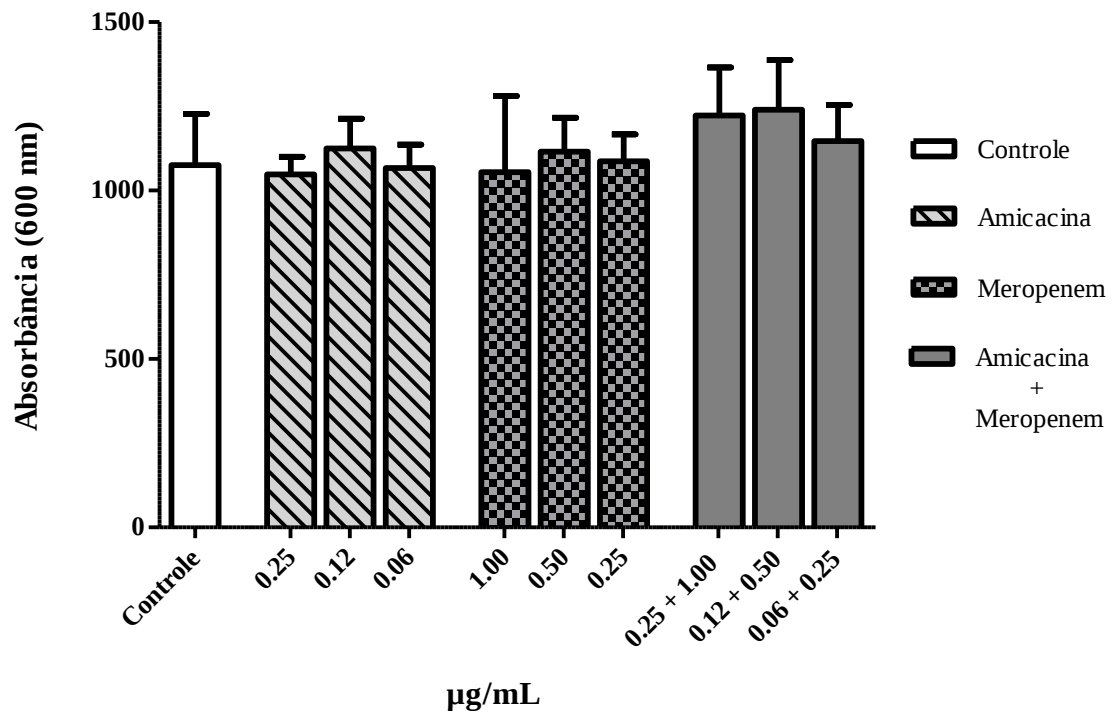
controle. Já quando na presença da amicacina sozinha na concentração de 0.25 µg/mL (1/2 CIM da associação), do meropenem sozinho e associado à polimixina B e amicacina, houve um aumento da formação de biofilme, com maior significância ($p < 0.0001$) quando na presença da associação de amicacina e meropenem e também do meropenem sozinho do que na presença da associação de meropenem e polimixina B ($p < 0.01$) (Fig. 2A-B).

A formação de biofilme pelo isolado K870, apenas aumentou na presença da concentração de 0.06 µg/mL de amicacina e de 0.12 µg/mL de meropenem (1/8 CIM da associação). Não foi observada alteração da formação nas concentrações de 0.12 µg/mL de amicacina e de 0.12 µg/mL polimixina B sozinhos (1/4 CIM da associação) e na concentração de 0.12 µg/mL (1/8 CIM da associação) do meropenem. Nas demais situações houve uma redução da formação de biofilme, inclusive na presença de 1/2 CIM da associação ambas as associações testadas, essa diminuição do biofilme formado foi estatisticamente significativa na presença apenas do meropenem na concentração de 0.25 µg/mL ($p < 0.0001$) e de 0.12 µg/mL ($p < 0.01$) (Fig. 3A-B).

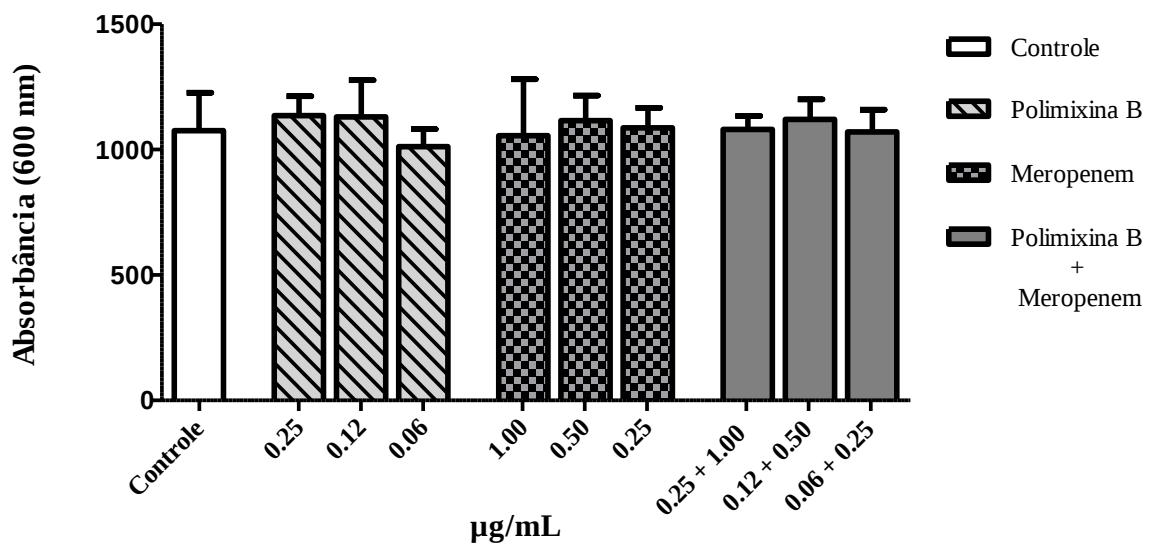
Comparando as associações testadas, a presença do meropenem com a polimixina B mostrou resultados melhores quando comparados a amicacina com meropenem, uma vez que a primeira associação pareceu não aumentar ou reduzir a formação de biofilme, como no caso do isolado K870. Já na segunda associação, houve um aumento para os isolados K07 e K94 (Figs. 1 e 2), enquanto para o isolado K870 as concentrações de 1/2 e 1/4 do CIM sinérgico reduziram a formação de biofilme (Fig.3).

Figura 1 (A-B) - Efeitos dos antimicrobianos amicacina, polimixina B e meropenem sozinhos e associados na formação de biofilme pelo isolado K07 de *K. pneumoniae*.

A



B

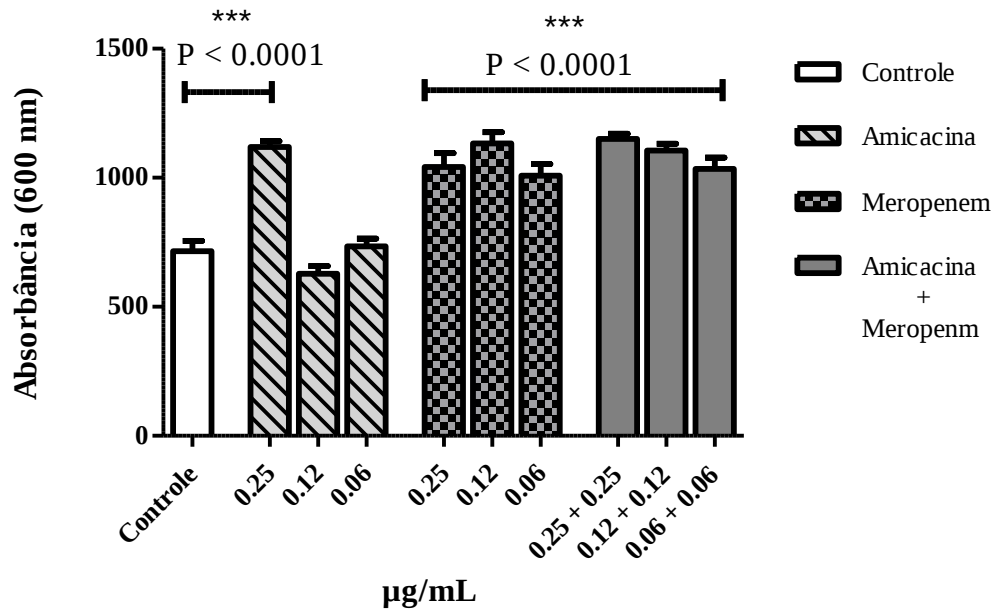


Legenda: Amicacina + Meropenem (A) e Polimixina B + Meropenem (B). Cada barra corresponde à média dos experimentos $\pm$ desvio padrão. *Significância de cada média em relação ao controle (ANOVA, $p < 0.05$).

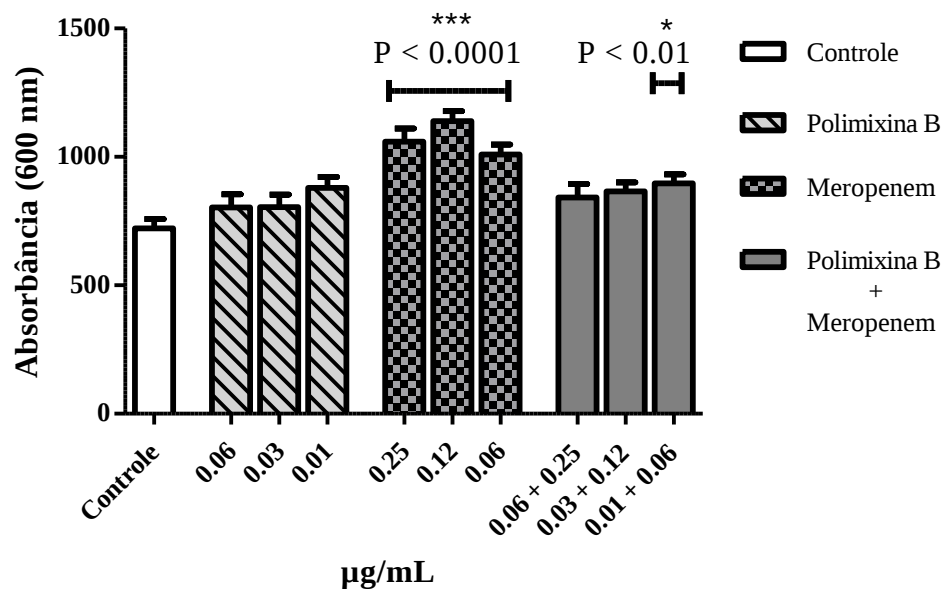
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 2 (A-B) - Efeitos dos antimicrobianos amicacina, polimixina B e meropenem sozinhos e associados na formação de biofilme pelo isolado K94 de *K. pneumoniae*.

A



B

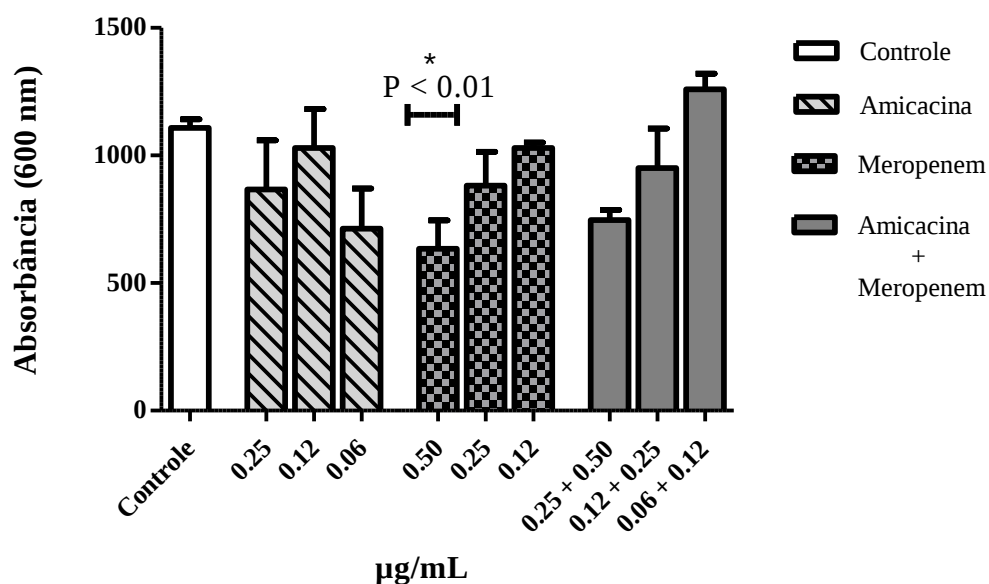


Legenda: Amicacina + Meropenem (A) e Polimixina B + Meropenem (B). Cada barra corresponde à média dos experimentos $\pm$ desvio padrão. *Significância de cada média em relação ao controle (ANOVA, $p < 0.05$).

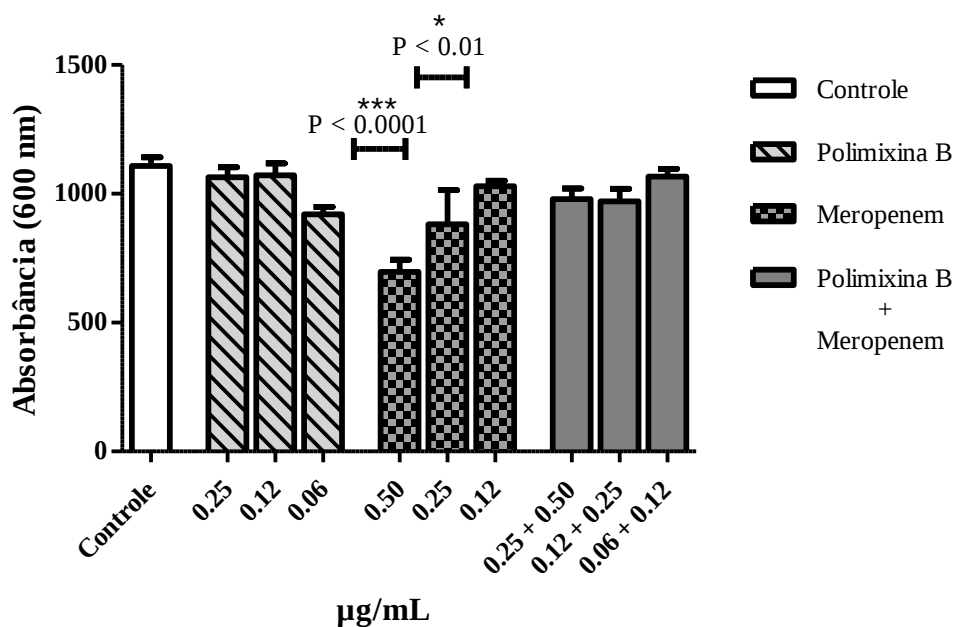
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 3 (A-B) - Efeitos dos antimicrobianos amicacina, polimixina B e meropenem sozinhos e associados na formação de biofilme pelo isolado K870 de *K. pneumoniae*.

A



B



Legenda: Amicacina + Meropenem (A) e Polimixina B + Meropenem (B). Cada barra corresponde à média dos experimentos $\pm$ desvio padrão. *Significância de cada média em relação ao controle (ANOVA, $p < 0.05$).

Fonte: elaborada pelo autor.

Expressão dos genes *bla_{KPC}*, *ecpA*, *fimH*, *mrkD*, *luxS*

Foi verificado através da RT-PCR qualitativa que os isolados K07, K94 e K870 expressaram os genes *bla_{KPC}*, *ecpA*, *fimH*, *mrkD*, *luxS* na condição controle, ou seja, na ausência de antimicrobiano. Os isolados continuaram expressando o gene de resistência *bla_{KPC}* e os genes de virulência *ecpA* e *luxS* mesmo quando submetidos aos antimicrobianos testados (amicacina, polimixina B, meropenem) sozinhos e nas associações, ao serem comparados com os respectivos controles sem tratamento (Tabela 5). O isolado K07 não expressou o gene *fimH* quando submetido aos antimicrobianos amicacina e meropenem (sozinhos e em associação), já o isolado K94 não expressou o gene *fimH* quando submetido aos antimicrobianos polimixina B e meropenem (sozinhos e em associação), o isolado K870 não expressou o gene *fimH*, quando submetido aos antimicrobianos amicacina e meropenem (sozinhos e em associação). A expressão do gene *mrkD* não ocorreu apenas quando o isolado K870 foi submetido ao meropenem sozinho e a associação do meropenem com a amicacina.

Tabela 5 - Expressão dos genes *bla_{KPC}*, *ecpA*, *fimH*, *mrkD*, *luxS* no biofilme formado na ausência e presença dos antimicrobianos amicacina (AMK), meropenem (MERO), polimixina B (POL) e das associações de amicacina e meropenem (AMK+MERO) e de polimixina B e meropenem (POL+MERO).

Isolados	Antimicrobianos	<i>bla_{KPC}</i>	<i>ecpA</i>	<i>fimH</i>	<i>mrkD</i>	<i>luxS</i>
K07	-	+	+	+	+	+
	AMK	+	+	-	+	+
	MERO	+	+	-	+	+
	POL	+	+	+	+	+
	AMK + MERO	+	+	-	+	+
	POL + MERO	+	+	+	+	+
K94	-	+	+	+	+	+
	AMK	+	+	+	+	+
	MERO	+	+	-	+	+
	POL	+	+	-	+	+
	AMK + MERO	+	+	+	+	+
	POL + MERO	+	+	-	+	+
K870	-	+	+	+	+	+
	AMK	+	+	-	-	+
	MERO	+	+	-	-	+
	POL	+	+	-	-	+
	AMK + MERO	+	+	+	-	+
	POL + MERO	+	+	+	-	+

Fonte: elaborada pelo autor.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Ao analisarmos as imagens ultraestruturais do biofilme formado pelo isolado **K07** de *K. pneumoniae*, tratado durante 24h, podemos observar que o padrão de formação do biofilme foi mantido quando comparado ao grupo sem tratamento (Fig. 4A-F). o grupo controle apresentou células com morfologia ainda preservadas, fortemente aderidas e com a presença de matriz polissacarídica consistente (Fig. 4A).

O biofilme formado na presença de 0.25 µg/mL de amicacina pode-se observar células com morfologias alteradas, aderidas com maior quantidade de matriz polissacarídica em relação ao controle (Fig. 4B). A figura 4C mostra o biofilme formado na presença de meropenem na concentração de 1 µg/mL, onde as células sem formas definidas estavam aderidas entre si formando um aglomerado celular, com presença de pouca matriz polissacarídica. O biofilme formado na presença da combinação de amicacina (0.25 µg/mL) com meropenem (1 µg/mL) foi composto por inúmeras células fortemente aderidas umas às outras com presença de matriz polissacarídica entre as células (Fig 4D).

Já o biofilme formado quando o isolado foi submetido a concentração de 0.25 $\mu\text{g/mL}$ de polimixina B, é observado provavelmente um estágio mais inicial da formação do biofilme, com poucas células agrupadas e pouca secreção de matriz polissacarídica (Fig. 4E). Por outro lado, o biofilme formado na presença de polimixina B (0.25 $\mu\text{g/mL}$) e meropenem (1 $\mu\text{g/mL}$) em associação, foi possível observar algumas células alongadas na superfície do aglomerado, indicando que embora o biofilme tenha sido formado, houve um maior dano celular não observado nas outras condições (Fig. 4F).

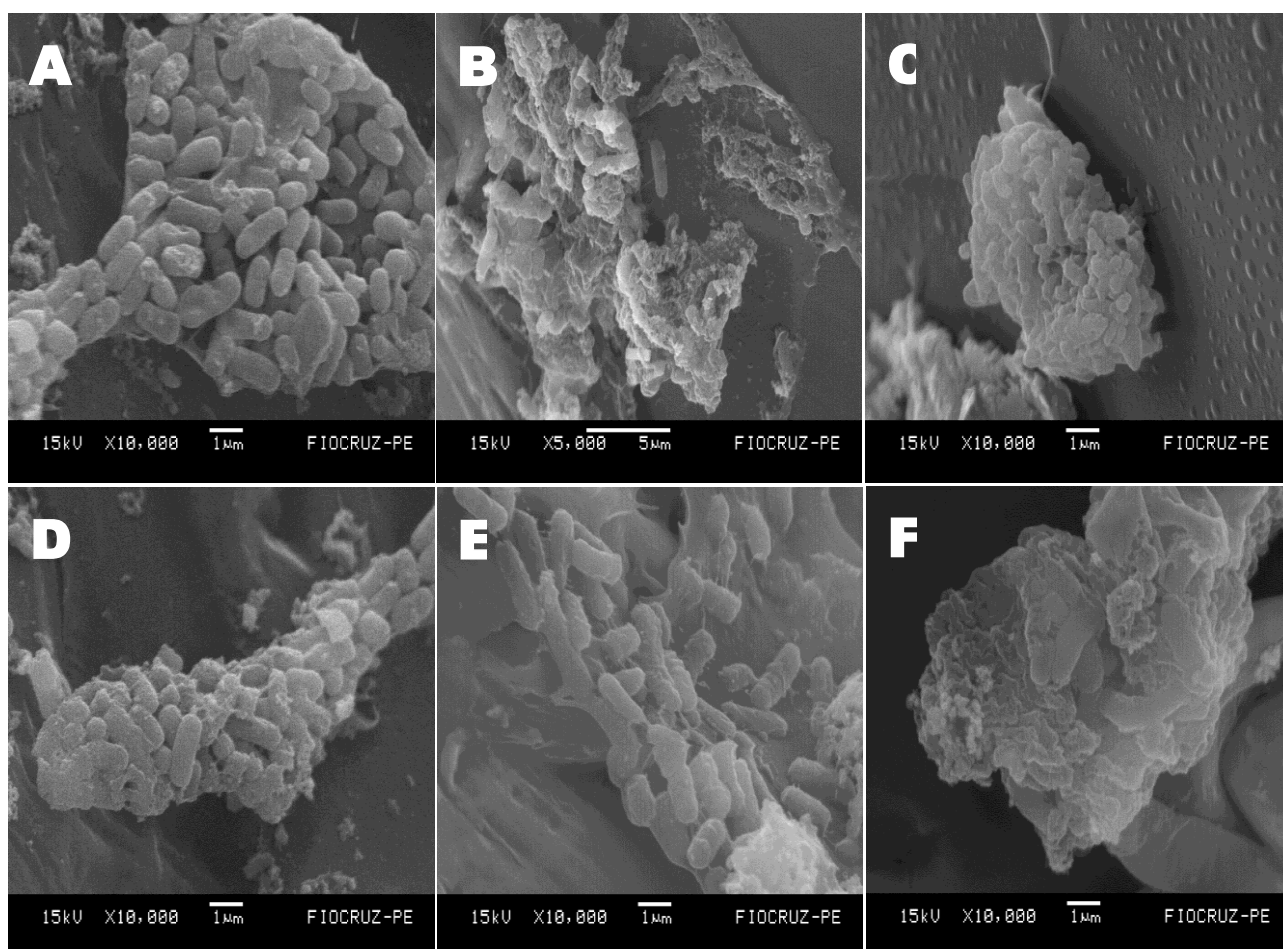


Fig. 4 (A-F) - Eletromicrografias isolado K07 de *K. pneumoniae* tratados com antimicrobianos durante a formação do biofilme. (A) controle; (B) Amicacina; (C) Meropenem; (D) Amicacina Meropenem; (E) Polimixina B e (F) Polimixina B e Meropenem.

Fonte: elaborada pelo autor

As imagens ultraestruturais do biofilme formado pelo isolado **K94** mostraram que o tratamento parece ter estimulado a formação do biofilme (Fig. 5A-F). Na condição controle foi possível observar células com morfologia preservada, aderidas entre si pela matriz polissacarídica (Fig. 5A). Quando submetido a amicacina na concentração de 0.25 $\mu\text{g/mL}$ foi possível observar células fortemente aderidas embebidas por matriz polissacarídica e com alterações em sua forma (Fig. 5B).

No biofilme formado quando o isolado foi submetido ao meropenem na concentração de 0.25 $\mu\text{g/mL}$ foi possível observar células aderidas, com morfologia alterada e arrançadas em camadas (Fig. 5C). O isolado na presença da associação de amicacina (0.25 $\mu\text{g/mL}$) e meropenem (0.25 $\mu\text{g/mL}$), pode-se visualizar o biofilme composto praticamente por matriz polissacarídica (Fig. 5D).

Já quando submetido a polimixina B na concentração de 0.06 $\mu\text{g/mL}$, pode-se observar as células fortemente aderidas envolvidas por matriz polissacarídica entre si formando aglomerados celulares (Fig. 5E). Enquanto que, o biofilme formado pelo isolado na presença da associação de polimixina B (0.06 $\mu\text{g/mL}$) com meropenem (0.25 $\mu\text{g/mL}$) apresentou poucas células aderidas, algumas apresentando alterações em sua forma e tamanho e grande quantidade de matriz polissacarídica frouxa (Fig. 5F).

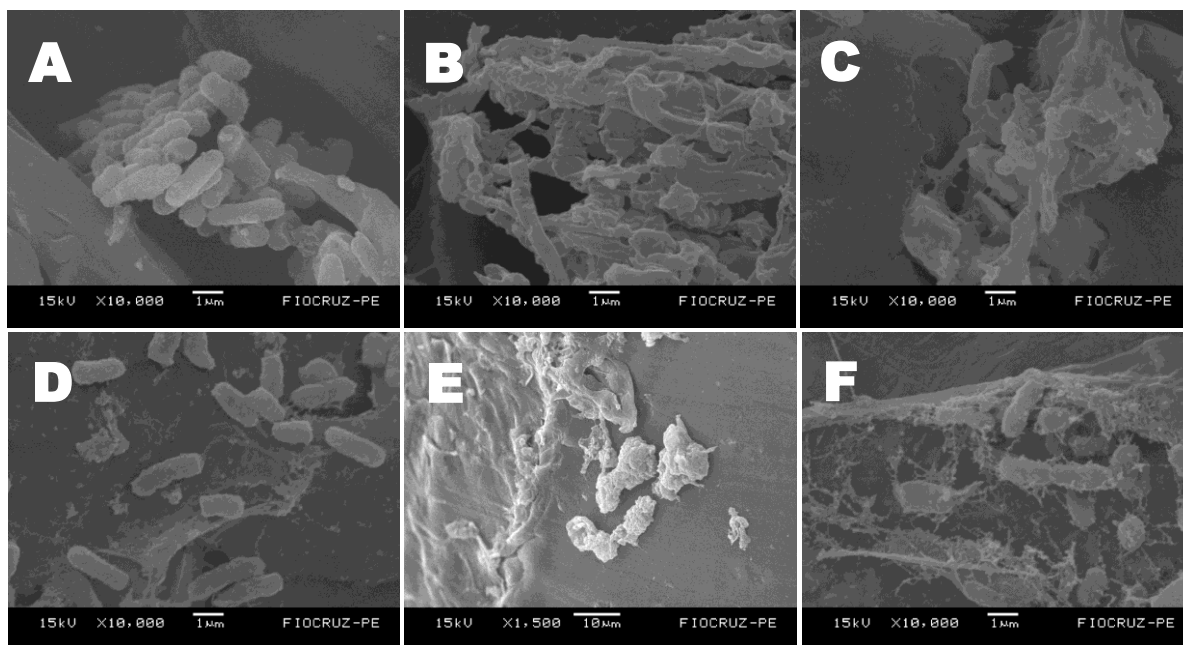


Fig. 5 (A-F) - Eletromicrografias isolado K94 de *K. pneumoniae* tratados com antimicrobianos durante a formação do biofilme. (A) controle; (B) Amicacina; (C) Meropenem; (D) Amicacina Meropenem; (E) Polimixina B e (F) Polimixina B e Meropenem.

Fonte: elaborada pelo autor.

O isolado K870 quando submetidos aos antimicrobianos apresentou uma diminuição na formação do biofilme quando comparado ao grupo controle ((Fig. 6A-F). Na condição controle, formou biofilme apresentando poucas células aderidas envolvidas por matriz polissacarídica (Fig. 6A). Quando submetido a amicacina na concentração de 0.25 $\mu\text{g/mL}$, foi observado o biofilme aderido à superfície do cateter, porém com poucas células visíveis que parecem revestida pela matriz polissacarídica secretada (Fig. 6B).

No biofilme submetido ao meropenem na concentração de 0.5 $\mu\text{g/mL}$, podemos observar poucas células algumas de forma arredondada aderidas pela matriz (Fig. 6C). O isolado na presença da associação de amicacina (0.25 $\mu\text{g/mL}$) com meropenem (0.5 $\mu\text{g/mL}$) encontramos poucas células visíveis e formando alguns aglomerados celulares envolvidas por matriz polissacarídica (Fig. 6D).

Já quando submetido a polimixina B na concentração de 0.25 $\mu\text{g/mL}$ foi possível observar as células aderidas e envolvidas por matriz polissacarídica muito semelhante ao controle (Fig. 6E). Enquanto o biofilme formado na presença da associação de polimixina B (0.25 $\mu\text{g/mL}$) com meropenem (0.5 $\mu\text{g/mL}$) células com alteração morfológica aderidas e envolvidas por matriz polissacarídica formando alguns aglomerados celulares (Fig. 6F).

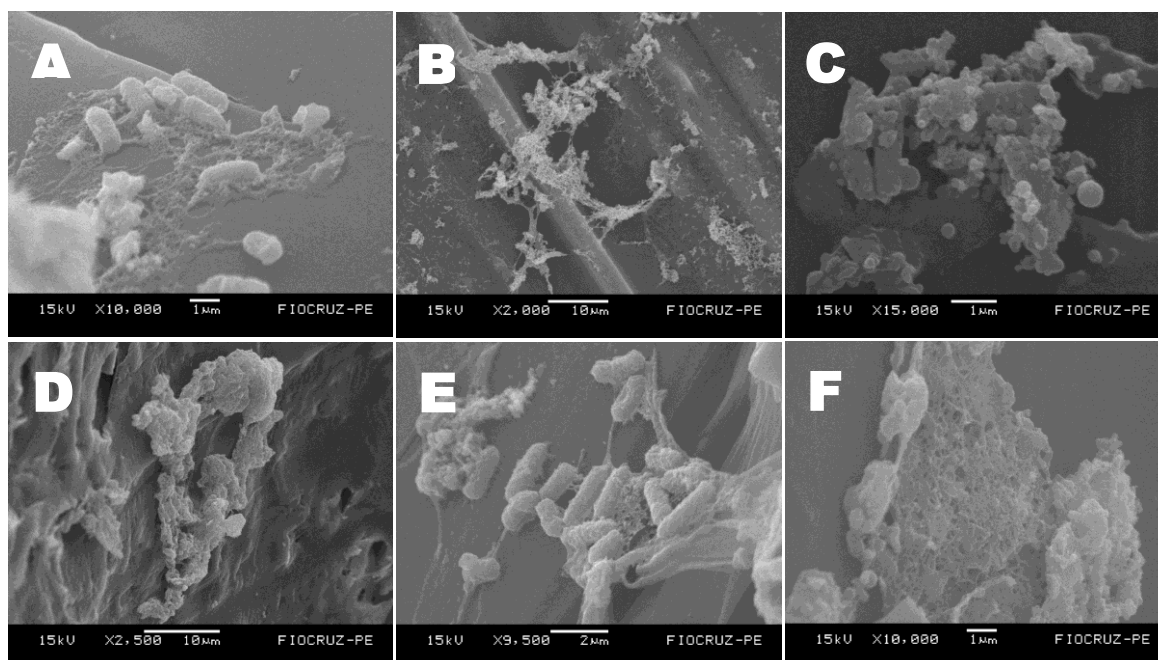


Fig. 6 (A-F) - Eletromicrografias isolado K870 de *K. pneumoniae* tratados com antimicrobianos durante a formação do biofilme. (A) controle; (B) Amicacina; (C) Meropenem; (D) Amicacina Meropenem; (E) Polimixina B e (F) Polimixina B e Meropenem.

Fonte: elaborada pelo autor.

Discussão

Os biofilmes bacterianos são comunidades microbianas de células aderidas à superfície, embebidas em uma matriz polissacarídica extracelular produzida pelas células bacterianas (Mohammed et al., 2013). O efeito de antimicrobianos na formação de biofilme é importante para o tratamento de infecções relacionadas ao biofilme, associadas ou não ao uso de dispositivos médicos invasivos causadas por *K. pneumoniae*. Alguns estudos têm mostrado que as bactérias associadas ao biofilme não são afetadas pelas concentrações alcançadas terapêuticamente de antimicrobianos, devido a tolerância antimicrobiana, as células persistentes, as células de crescimento lento e a matriz exopolissacarídica. (Singh et al., 2016; Ciofu et al., 2017). Uma das formas viáveis para combater a resistência associada ao biofilme é através do uso de combinações de antimicrobianos com efeitos sinérgicos, podendo retardar o surgimento do biofilme (Ciofu et al., 2017; Hughes et al., 2017).

Neste estudo, foi avaliada a atividade sinérgica de antimicrobianos associados e a atividade *in vitro* de antibióticos comumente utilizados na prática clínica sozinhos e em combinação em concentrações inferiores a sinérgica determinada para células planctônicas na formação de biofilme por *K. pneumoniae* e na expressão de genes de virulência. Foi verificado que todos os isolados, exceto K952, apresentavam resistência ao meropenem, mas eram sensíveis a amicacina e a polimixina B. Entretanto, para a morte dos biofilmes bacterianos pode ser necessária uma concentração de antimicrobianos até 10000 vezes maior que aquela para matar uma célula planctônica (Donlan, 2001, 2002). É preconizado pela Anvisa que as infecções causadas por cepas produtoras de KPC sejam tratadas com uma terapia combinada e não monoterapia, como a associação de meropenem com a amicacina e polimixina B (Anvisa, 2014).

No nosso estudo podemos verificar que houve um maior efeito sinérgico da combinação do meropenem com a polimixina B do que com a amicacina frente aos isolados de *K. pneumoniae* testados. Esse sinergismo também foi observado por outros estudos, com outras espécies bacterianas (Nakamura et al., 2000; Lee et al., 2013; Jiang et al., 2018).

Alguns estudos constataram que baixas concentrações de alguns antimicrobianos poderiam aumentar a formação de biofilme bacteriano (Kaplan, 2011; Wu et al., 2014; Aka et al., 2015; Sato et al., 2018). Entretanto, existem relatos na literatura mostrando que sub-CIMs de alguns antimicrobianos incapazes de matar as bactérias, podem inibir a formação de biofilme (Bret; Di Martino, 2004; Wojnicks, 2013; Otani et al., 2018). Os nossos dados corroboram com estes estudos, pois os diferentes antimicrobianos testados promoveram efeitos distintos na formação de biofilme nos três isolados de *K. pneumoniae*.

Wang et al (2016) avaliaram os efeitos de meropenem e tigeciclina sozinhos e associados com sulbactam no biofilme formado, foi observado que a associação sempre apresentou uma diminuição no biofilme formado quando comparado com o antimicrobiano utilizado individualmente. Estudo realizado por Lenhard e colaboradores (2017) mostrou que a formação de biofilme foi induzida por sub-CIM de antimicrobiano em aproximadamente duas vezes, e um aumento da expressão de genes relevantes para a colonização.

As bactérias são expostas a baixas concentrações de antimicrobianos no início e no final do tratamento e essas doses baixas podem levar ao aumento da formação de biofilme, agravando a infecção, dessa forma, nossos dados mostram a importância de conhecer a ação dos antimicrobianos utilizados na prática clínica sozinhos ou em combinação que pode eliminar a bactéria ou servir de estímulo para formação de biofilme onde neste caso pode levar a complicações para o paciente.

Além da forma de vida planctônica, as bactérias podem se apresentar formando biofilmes, comunidades bacterianas responsáveis por pelo menos 65% de todas as infecções bacterianas em humano (Mah and O'Toole, 2000; De la Fuente-Núñez et al., 2013). As células de um biofilme podem se comunicar umas com as outras e regular sua fisiologia através de moléculas de sinalização química, esse fenômeno é denominado de *quorum sensing* (Zhu et al., 2011; Ju et al., 2018). Os sinais químicos produzidos neste processo são denominados autoindutores (AIs), o AI-2 é o sinal mais difundido de *quorum sensing*, a produção desse autoindutor de detecção de quorum-2 (AI-2) pode ser avaliada através da expressão do gene *luxS* codificador da enzima LuxS que desempenha um papel essencial na síntese de AI-2 (Balestrino et al., 2005; De Araújo et al., 2010; Ju et al., 2018). Foi visto por alguns autores que a ausência do gene *luxS*, impediu a formação de biofilme (Keersmaecker et al., 2005; Xu et al., 2006; Ju et al., 2018). No nosso estudo, podemos observar que os isolados continuaram sendo capazes de formar biofilme e permaneceram expressando o gene *luxS*, mesmo com a submissão aos antimicrobianos sozinhos e associados.

Hong et al., (2013) e Landman et al. (2009) observaram uma diferença de expressão das porinas em isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC quando submetidos a associação de carbapenêmicos e colistina. No nosso estudo, foi observado que o gene *bla_{KPC-2}* continuou sendo expresso, mas não podemos avaliar qual a diferença de expressão deste gene nos isolados submetidos a ação de antimicrobianos sozinhos e em associação.

Assim como os genes *luxS* e *bla_{KPC-2}*, a expressão do gene *ecpA* permaneceu, mesmo na presença dos antimicrobianos sozinhos e associados. Entretanto, em relação ao gene *fimH*, observamos que não foi expresso no isolado K07 quando exposto a amicacina e ao meropenem

sozinhos e em associação; no isolado K94 quando exposto à 0.5 CIM da associação de meropenem e polimixina B sozinhos e associados e no isolado K870 além de não ocorrer a expressão do gene *fimH* quando submetido à 0.5 CIM da associação de amicacina, meropenem e polimixina B sozinhos e associados, também não foi expresso o gene *mrkD* após a submissão aos antimicrobianos. Sendo assim, o efeito os antimicrobianos na expressão do gene *fimH* e *mrkD* variou de acordo com cada isolado.

Szczuka et al (2014) avaliaram o efeito de sub-CIMs de tigeciclina e ciprofloxacina na expressão de genes associados ao biofilme em *Staphylococcus aureus* e foi observado na maioria dos isolados que a expressão dos genes aumentou após a exposição a 0.25 CIM e 0.5 CIM de tigeciclina, já o efeito da exposição à ciprofloxacina foi dependente do isolado. Otto et al (2013) testaram o efeito de concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos sobre alguns fatores de virulência de *Staphylococcus* e constatou alterações na expressão nos genes testados dependente do antimicrobiano, podendo ser diminuída ou aumentada. Cada fator de virulência teve sua expressão variada nas concentrações dos antimicrobianos testados. No nosso estudo, foi observado que os biofilmes formados pelos isolados se comportaram de maneiras diferente quanto a expressão dos genes *fimH* e *mrkD* ao serem submetidos à uma determinada concentração dos antimicrobioanos, corroborando com Szczuka et al (2014) e Otto et al (2013) sugerindo que o antimicrobiano pode induzir ou não a expressão destes genes dependendo do isolado e da concentração testada.

Stalhut et al. (2012) observaram que as fímbrias do tipo 1 e tipo 3 expressas por *K. pneumoniae* aumentam a formação de biofilme em cateteres urinários e mostraram que as fímbrias compensam a ausência da outra para formação de biofilme. As fímbrias do tipo 3 medeiam a ligação ao tecido alvo utilizando a adesina *mrkD* que está associada ao eixo fimbrial constituído pela proteína *mrkA* (Langstrat et al., 2001). No nosso estudo, o isolado K870 foi capaz de formar biofilme mesmo não havendo a expressão dos genes *fimH* e *mrkD*. Este fato é reforçado pelo estudo de Langstraat et al (2001), onde os autores observaram que não existiu forte relação entre a adesina *mrkD* e formação do biofilme por *Klebsiella pneumoniae*, o que pode explicar a formação de biofilme sem a expressão do gene *mrkD* para o isolado K870.

Embora os carbapenêmicos, antibióticos que atuam na síntese da parede celular bacteriana com amplo espectro de ação e apresentam baixa toxicidade para os pacientes, sejam a principal estratégia de tratamento para infecções invasivas causadas por *K. pneumoniae*, o surgimento da resistência aos carbapenêmicos tem impedido o sucesso terapêutico com a monoterapia (Deshpande, et al., 2006; Teo et al., 2015). Uma das alternativas para o tratamento

eficaz dessas infecções é a terapia combinada (Le et al., 2011; Tamma et al., 2012; Garcinuño et al., 2016).

No estudo de Le et al. (2011) foi detectado um efeito sinérgico das associações de meropenem ou imipenem com amicacina frente isolados *K. pneumoniae* produtores de KPC-3, o que corrobora com nossos resultados, já que essa associação foi sinérgica ou aditiva frente os 10 isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2.

A atividade sinérgica da polimixina B com outros agentes antimicrobianos foi observado no estudo de Bratu (2005) e Eleman (2010) frente isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e produtores de KPC. Jiang et al 2018 avaliou inúmeras combinações frente isolados de *A. baumannii* e observaram um efeito potencialmente sinérgico do meropenem principalmente associado a polimixina B e a rimfampicina. Esse efeito sinérgico entre meropenem e polimixina B frente isolados de *A. baumannii* também foi observado por Lenhard et al. (2017).

Os biofilmes bacterianos são comunidades microbianas de células aderidas à superfície, embebidas em uma matriz polissacarídica extracelular produzida pelas células bacterianas (Mohammed et al., 2013). Um estudo realizado por Beganovic et al (2019) com isolados de *A. baumannii* observou que o meropenem e a polimixina B foram capazes de impedir a formação de biofilme em concentrações clinicamente relevantes, já a amicacina aumentou ou não alterou a produção de biofilme. Em nossos ensaios utilizando a mesma técnica usada por Beganovic et al. (2019), observamos que a amicacina teve um efeito semelhante de não alterar ou aumentar a formação de biofilme como ocorreu com o isolado K94. Entretanto, em nosso estudo através das imagens obtidas por MEV foi possível observar alterações morfológicas quando na presença de amicacina, o que pode indicar que embora o isolado tenha sido capaz de formar o biofilme, houve modificações morfológicas que possivelmente devem acarretar, além de injúrias estruturais, também funcionais.

Segundo Wojnicz e Tichaczek-Goska (2013), sub-CIMs de amicacina podem ser úteis no tratamento de infecções associada a formação de biofilme por *Escherichia coli*. No nosso estudo, o isolado K870 quando submetido a amicacina foi possível observar uma redução na quantidade de células e no isolado K94 na presença de amicacina observamos células com alterações morfológicas. Em um estudo realizado por Cironi et al. (2011) foi observado um efeito da amicacina em reduzir a formação de biofilme, entretanto esse efeito foi potencializado quando houve a associação com a claritromicina, um macrolídeo que possivelmente inibe fatores de virulência. A diminuição da formação de biofilme devido a sub-CIMs dos antibióticos ceftazidima e amicacina também foi observada por Bret e Di Martino (2004).

Em nosso estudo, podemos observar que a associação do meropenem com a amicacina no isolado K870 provocou modificações celulares, embora não tenha ocorrido diminuição com relevância estatística pelo ensaio de quantificação de biofilme pelo método cristal violeta, pelas análises das imagens observamos alterações na quantidade de células aderidas, na produção de matriz polissacarídica e morfológicas. Além disso, no isolado K870 quando submetido ao meropenem foi possível visualizar células arredondadas, assim como descrito anteriormente, devido ao mecanismo de ação do meropenem que atua nas PBPs (proteínas fixadoras de penicilina), o bloqueio da PBP-2 pode acarretar em alterações morfológicas, como células esféricas (Buijs et al., 2008; Hilliard et al., 2011; Veras et al., 2015; Scavuzi et al., 2016). Alterações morfológicas causadas por concentrações sub-inibitórias de carbapenêmicos foram descritas também em *A. baumannii* (Bernabeu-Wittel et al., 2004)

A atividade sinérgica da polimixina B com o meropenem assim como mostrado no nosso estudo, foi relatada anteriormente por Barth et al. (2015) em isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2. Rahim et al (2015) realizou um estudo com isolados de *K. pneumoniae* submetidos a polimixina B e ao cloranfenicol, foi observado que o tratamento apenas com polimixina B produziu alterações significativas na membrana externa, com protuberâncias e bolhas compatível com o mecanismo de ação da polimixina B, já o tratamento combinado causou danos mais severos na superfície celular que se assemelharam às mudanças combinadas observadas com os tratamentos individuais. Atualmente, diante do aumento da resistência bacteriana, o tratamento combinado com a polimixina B visa aumentar a atividade bactericida e prevenir o desenvolvimento de resistência (Bergen et al., 2015).

Conclusão

Podemos concluir no nosso estudo que a associação de meropenem com a amicacina e com a polimixina B pode ser uma alternativa para o tratamento de bactérias produtoras de *bla*_{KPC-2}, já que os valores das CIM dos antimicrobianos foram reduzidos a concentrações que possam ser utilizadas no tratamento de pacientes. Além disso, concentrações sub-letais dos antimicrobianos sozinhos e em associação podem provocar alterações na morfologia do biofilme e na expressão dos genes associados a formação de biofilme.

Agradecimentos

Os autores desejam expressar sinceros agradecimentos aos revisores comentários valiosos sobre o manuscrito, ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas/IAM/FIOCRUZ e ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA da Universidade Federal de Pernambuco. Este trabalho foi apoiado pelo programa PAPES/FIOCRUZ nº 407826/2012-2 e FACEPE-

Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco. Não há conflito de interesse para qualquer um dos autores.

Referências

- Ahmed, S., Darouiche, R.O., 2015. Anti-biofilm Agents in Control of Device-Related Infections. *Adv. Exp. Med. Biol.* II, 137–146. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-09782-4>
- Aka, S.T., Haji, S.H., 2015. Sub-MIC of antibiotics induced biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of chlorhexidine. *Brazilian J. Microbiol.* 46, 149–154. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120140218>
- Alcántar-Curiel, M.D., et al., 2013. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence.* 4, 129–138. <https://doi.org/10.4161/viru.22974>
- Anbazhagan, D., et al., 2012. Detection of quorum sensing signal molecules and identification of an autoinducer synthase gene among biofilm forming clinical isolates of *Acinetobacter* spp. *PLoS One.* 7, e36696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036696>
- Anderl, J.N., 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44, 1818–24. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1818-1824.2000>
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Nota Técnica nº 01/2013: medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. Brasília; 2013. Available from: <http://www.portal.anvisa.gov.br>
- Ares, M., 2016. H-NS Nucleoid Protein Controls Virulence Features of *Klebsiella pneumoniae* by Regulating the Expression of Type 3 Pili and the Capsule Polysaccharide. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00013>
- Balestrino, D., et al., 2008. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* *in vitro* biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. *Environ. Microbiol.* 10, 685–701. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01491.x>
- Balestrino, D., 2005. Characterization of type 2 quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. *J. Bacteriol.* 187, 2870–2880. <https://doi.org/10.1128/JB.187.8.2870>
- Bandeira, M., 2014. Exploring dangerous connections between *Klebsiella pneumoniae* biofilms and Healthcare-associated infections. *Pathogens.* 720–731. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030720>
- Barth, N., 2015. *In vitro* activity of polymyxin B plus imipenem, meropenem or tigecycline against KPC-2-producing Enterobacteriaceae with high minimal inhibitory concentrations for these antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(6):3596-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.00365-15>
- Beganovic, M., 2019. Biofilm prevention concentrations (BPC) of minocycline compared

to polymyxin B, meropenem, and amikacin against *Acinetobacter baumannii*. Diagnostic Microbiol. Infect. Dis. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.01.016>

Bergen, P.J., 2015. Polymyxin combinations: pharmacokinetics and pharmacodynamics for rationale use. Pharmacotherapy. 35(1):34-42. <https://doi.org/10.1002/phar.1537>

Bratu, S., 2005. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn , New York : epidemiology and recommendations for detection. Antimicrob. Agents. Chemother. 49(7), 3018–3020. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.3018>

Bret, L., P, D.M., 2004. Effect of ceftazidime , amikacin and ciprofloxacin on biofilm formation by some enterobacterial clinical isolates . PubMed Commons. Chemotherapy 50, 255–259.

Bellifa, S., 2013. Evaluation of biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the University Hospital of Tlemcen , Algeria. Afr. J. Microbiol. Res. 7, 5558–5564. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.2331>

Bergen, P.J., 2015. Polymyxin Combinations : Pharmacokinetics and Pharmacodynamics for Rationale Use. Pharmacotherapy 35, 34–42. <https://doi.org/10.1002/phar.1537>

Bernabeu-Wittel, C., 2005. Pharmacokinetic / pharmacodynamic assessment of the in-vivo efficacy of imipenem alone or in combination with amikacin for the treatment of experimental multiresistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia. Clin. Microbiol. Infect. 11, 319–324. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01095>.

Buijs, J., Dofferhoff, A.S.M., Mouton, J.W., Wagenvoort, J.H.T., Meer, J.W.M. Van Der, 2008. Concentration-dependency of b-lactam-induced filament formation in Gram-negative bacteria. Clin. Microbiol. Infect. 14, 344–349.

Ciofu, Oana; Estrella, Rojo-Molinero Maria D., Macià; Oliver, Antonio, Antibiotic treatment of biofilm infections, APMIS, v. 125, p. 304–319, 2017.

Cirioni, O., Ghiselli, R., Silvestri, C., Minardi, D., Gabrielli, E., Orlando, F., Rimini, M., Brescini, L., Muzzonigro, G., Guerrieri, M., Giacometti, A., 2011. Effect of the combination of clarithromycin and amikacin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in an animal model of ureteral stent infection. J. Antimicrob. Chemother. 66, 1318–23. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr107>

Chen, F., 2011. Structural and mechanical properties of *Klebsiella pneumoniae* type 3 Fimbriae. J. Bacteriol. 193, 1718–25. <https://doi.org/10.1128/JB.01395-10>

CLSI, Clinical & Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100. 27^a ed., 2017.

Costerton, J. W., & Demeo, P., Discussion: The Role of Biofilms: Are We Hitting the Right Target?, Plastic and Reconstructive Surgery, v. 127, p. 36–37, 2011.

Costerton, J William, Biofilms in orthopaedic infections Biofilm Theory Can Guide the Treatment of Device-Related Orthopaedic Infections, Clinical Orthopaedics and Related Research, n. 437, p. 7–11, 2005.

De Araujo, C., 2010. Quorum sensing affects biofilm formation through lipopolysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. Res. Microbiol. 161, 595–603. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.014>

De la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L., Hancock, R.E.W., 2013. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies. Curr. Opin. Microbiol. 16, 580–589. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.013>

Deshpande, L.M., 2006. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States Medical Centers: Report from the MYSTIC Program (1999-2005). Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 56, 367–372. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.07.004>

Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg. Infect. Dis. 8, 881–90. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>

Donlan, R.M., 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. Clin. Infect. Dis. 33, 1387–1392. <https://doi.org/10.1086/322972>

Elemam, A., 2010. *In vitro* evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant. J Clin Microbiol. 48, 3558-3562. <https://doi.org/10.1128/JCM.01106-10>

Garcinuño, P., 2016. Empirical monotherapy with meropenem or combination therapy : the microbiological point of view. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1851–1855. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2737-2>

Ghafourian, S. et al. Extended Spectrum Beta-lactamases : Definition , Classification and Epidemiology. Curr. Issues Mol. Biol., v. 17, p. 11–22, 2015

Hennequin, C., 2012. Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. J. Antimicrob. Chemother. 67, 2123–30. <https://doi.org/10.1093/jac/dks169>

Hilliard, J.J., 2011. Comparative effects of carbapenems on bacterial load and host immune response in a *Klebsiella pneumoniae* murine pneumonia model. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 836–844. <https://doi.org/10.1128/AAC.00670-10>

Hong, J.H., 2013. Characterization of Porin Expression in *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* identifies isolates 57, 2147–2153. Antimicrob. Agents. Chemother. <https://doi.org/10.1128/AAC.02411-12>

Hughes, G.; Webber, M. A. Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. British Journal of Pharmacology, v. 174, n. 14, p. 2237–2246, 2017.

- Jagnow, J., Clegg, S., 2003. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. Microbiol. 149, 2397–2405. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26434-0>
- Jamal, M., 2018. Bacterial biofilm and associated infections. J. Chinese Med. Assoc. 81, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
- Jiang, ern Z., Xianxia he, J. li2, 2018. Synergy effect of meropenem-based combinations against *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis. Infect. Drug Resist. 11, 1083–1095
- Ju, X., 2018. Effect of the *luxS* gene on biofilm formation and antibiotic resistance by *Salmonella* serovar Dublin. Food Res Int. 107, 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.039>
- Kaplan, J.B., 2011. Antibiotic-induced biofilm formation. Int. J. Artif. Organs. 34, 737–51. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000027>
- Keersmaecker, S.C.J. De, Varszegi, C., Boxel, N. Van, Habel, L.W., Metzger, K., Daniels, R., Marchal, K., Vos, D. De, Vanderleyden, J., 2005. Chemical Synthesis of (S) -4 , 5-Dihydroxy-2 , 3-pentanedione , a Bacterial Signal Molecule Precursor , and Validation of Its Activity in *Salmonella typhimurium* * □. J. Biol. Chem. 280, 19563–19568. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412660200>
- Kumar, J. V. Siji, B.N., Mohandas, C., 2012. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. World J Microbiol Biotechnol 28, 3143–3150. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1124-0>
- Landman, D., 2009. Contribution of ompK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. J. Med. Microbiol. 58, 1303–8. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.012575-0>
- Langstraat, J., 2001. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. Infect. Immun. 69, 5805–5812. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5805>
- Le, J., 2011. *In vitro* activity of carbapenems alone and in combination with amikacin against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. J. Clin. Med. Res. 3, 106-10. <https://doi.org/10.4021/jocmr551w>
- Lee, G.C., Burgess, D.S., 2013. Polymyxins and Doripenem Combination Against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Med Res 5, 97–100.
- Lenhard, J.R., 2017. High-intensity meropenem combinations with polymyxin B: new strategies to overcome carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 72(1):153-165. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw355>
- Lewis, K.I.M., 2001. Riddle of Biofilm Resistance KIM. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 999–1007. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999>

Mah, T.F., O'Toole, G. a, 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9, 34–9.

Mohammed, A., Nerland, A.H., Al-haroni, M., Bakken, V., 2013. polymeric matrix , and treatment of. *J. Oral Microbiol.* 2013. 1, 1–9.

Murphy, C.N., 2013. Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. *Infect. Immun.* 81, 3009–3017. <https://doi.org/10.1128/IAI.00348-13>

Nakamura, A., 2000. Combined effects of meropenem and aminoglycosides on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 901-4. <https://doi.org/10.1093/jac/46.6.901>

Narasanna, R. et al. Effect of subinhibitory concentration of cefetoxime on biofilm formation. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*, v. 7, n. 2, p. 67–74, 2017.

Otani, S., Hiramatsu, K., Hashinaga, K., Komiya, K., 2018. Sub-minimum inhibitory concentrations of ceftazidime inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J. Infect. Chemother.* 24, 428–433. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.01.007>

Otto, M. P. et al. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2013;, v. 68, p. 1524–1532, 2013.

Rahim, N.A., 2015. Synergistic killing of NDM-producing MDR *Klebsiella pneumoniae* by two “old” antibiotics-polymyxin B and chloramphenicol. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 2589–2597. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv135>

Rosa, F.G. De, Corcione, S., Cavallo, R., Perri, G. Di, Basetti, M., 2015. Critical issues for *Klebsiella pneumoniae* KPC-carbapenemase producing *K. pneumoniae* infections : a critical agenda. *Future Microbiol.* 10, 283–294.

Sambrook, J., Maniatis, T.; Fritsch, E. F. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Sato, Y., Unno, Y., Ubagai, T., Ono, Y., 2018. Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote *Acinetobacter baumannii* biofilm formation 1–18

Scavuzzi, L., Alves, L.C., Veras, D.L., Catarina, A., Lopes, S., 2016. Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla KPC-2 gene. *J. Med. Microbiol.* 65, 1370–1377. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000367>

Szczuka, E., Kaznowski, A., 2014. Antimicrobial activity of tigecycline alone or in combination with rifampin against *Staphylococcus epidermidis* in biofilm. *Folia Microbiol. (Praha)*. 59, 283–288. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0296-9>

Singh, R. et al. Penetration barrier contributes to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics, and exhibits genus-, strain- and antibiotic-specific differences. *Pathogens and Disease*, v. 74, n. 6, p. 1–6, 2016.

Singhai, M., 2012. A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. *J. Glob. Infect. Dis.* 4, 193-8. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.103896>

Singla, S., 2013. Susceptibility of different phases of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* to three different antibiotics. *J. Antibiot.* (Tokyo). 66, 61–66. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.101>

Stepanovic, S., 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods.* 40, 175–9. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)

Stephanovic, S., 2007. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by Staphylococci. *Apmis* 115, 891–899.

Stewart, P.S., Costerton, J.W., 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. 358, 135–138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1)

Tamma, P.D., 2012. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 450–470. <https://doi.org/10.1128/CMR.05041-11>

Teo, J., 2015. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Thai hospital: a molecular epidemiologic analysis and identification of bactericidal Polymyxin B-based combinations. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 4, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13756-015-0043-x>

Trautner, B., Darouiche, R., 2004. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. 32, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2003.08.005>.

Veras, D.L., 2015. Ultrastructural changes in clinical and microbiota isolates of *Klebsiella pneumoniae* carriers of genes blaSHV, blaTEM, blaCTX-M, or blaKPC when subject to β -lactam antibiotics. *Sci. World J.* 2015, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/572128>

Vuotto, C., 2017. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J. Appl. Microbiol.* 123, 1003–1018. <https://doi.org/10.1111/jam.13533>

Wang, H., 2016. Increased biofilm formation ability in *Klebsiella pneumoniae* after short-term exposure to a simulated microgravity environment. *Microbiologyopen.* 5, 793–801. <https://doi.org/10.1002/mbo3.370>

Wojnicz, D., Tichaczek-Goska, D., 2013. Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin, amikacin and colistin on biofilm formation and virulence factors of *Escherichia coli* planktonic and biofilm forms isolated from human urine. *Braz. J. Microbiol.* 44, 259–65. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000100037>

Wu, S., 2014. Beta-lactam antibiotics stimulate biofilm formation in non-typeable *Haemophilus influenzae* by up-regulating carbohydrate metabolism. PLoS One. 9;9(7):e99204. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099204>

Xu, L., Li, H., Vuong, C., Vadyvaloo, V., Wang, J., Yao, Y., Otto, M., Gao, Q., 2006. Role of the *luxS* Quorum-Sensing System in Biofilm Formation and Virulence of *Staphylococcus epidermidis*. Infect. Immun. 74, 488–496. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.488>

Zhu, H., 2011. A *luxS*-dependent transcript profile of cell-to-cell communication in *Klebsiella pneumoniae*. Mol. Biosyst. 7, 3164. <https://doi.org/10.1039/c1mb05314k>

6 CONCLUSÕES

- Todos os isolados de *K. pneumoniae* estudados mostraram resistência a múltiplos antimicrobianos e alta frequência de genes de virulência relacionados à formação de biofilme tanto em isolados portadores do gene *bla_{KPC-2}*;
- Houve a disseminação clonal entre hospitais diferentes na cidade de Recife-PE;
- A capacidade de formar biofilme é um fator de virulência presente em isolados de *K. pneumoniae* na cidade de Recife-PE;
- Como a maioria dos isolados foram fortes ou moderados formadores de biofilme, a presença do gene *bla_{KPC-2}* parece não interferir na formação de biofilme;
- As associações de meropenem com a amicacina e a polimixina B apresentaram um efeito sinérgico ou aditivo frente isolados de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla_{KPC-2}*;
- Concentrações sub-inibitórias dos antimicrobianos sozinhos e em associação podem provocar alterações na morfologia do biofilme e na expressão dos genes associados a formação de biofilme.

REFERÊNCIAS

- ADAMS-SAPPER, S. et al. Rapid induction of high-level carbapenem resistance in heteroresistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3281-3289, 2015.
- 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. 129–38, 2013.
- ALDECOA, A. L.; ZAFRA, O.; GONZÁLEZ-PASTOR, J. E. Mechanisms and regulation of extracellular DNA release and its biological roles in microbial communities. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–19, 2017.
- ALLEN, B. L.; GERLACH, G. F.; CLEGG, S. Nucleotide sequence and functions of *mrk* determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 916–20, 1991.
- ALMAGHRABI, R. et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains exhibit diversity in aminoglycoside-modifying enzymes, which exert differing effects on plazomicin and other agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4443–4451, 2014.
- ALVES, M. S. et al. Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3640–3646, 2006.
- ANBAZHAGAN, D. et al. Detection of quorum sensing signal molecules and identification of an autoinducer synthase gene among biofilm forming clinical isolates of *Acinetobacter* spp. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e36696, 2012.
- APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 526–530, 2008.
- ARAÚJO et al. Hypervirulence and biofilm production in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 58, p. 523–528, 2018.
- ARENA, F. et al. Infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with hypermucoviscous phenotype: A case report and literature review. **Virulence**, v. 8, n. 8, p. 1900–1908, 2017.
- ARES, M. A. et al. H-NS nucleoid protein controls virulence features of *Klebsiella pneumoniae* by regulating the expression of type 3 pili and the capsule polysaccharide. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, p. 13, 2016.
- ARES, M. A. et al. Additional regulatory activities of MrkH for the transcriptional expression of the *Klebsiella pneumoniae* *mrk* genes: Antagonist of H-NS and repressor. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. 1–16, 2017.

ARMSTRONG, E. S.; MILLER, G. H. Combating evolution with intelligent design: The neoglycoside ACHN-490. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 565–573, 2010.

AZEVEDO, N.F.; CERCA, N. (2012). **Biofilmes: na Saúde, no Ambiente, na Indústria** (1. ed.). Portugal: Publindústria Edições Técnicas. p.389.

AZEVEDO, P. A. A. et al. Detection of virulence and β -lactamase encoding genes in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 224–228, 2018.

BALESTRINO, D. et al. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* *in vitro* biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 685–701, 2008.

BALESTRINO, D. et al. Characterization of Type 2 Quorum Sensing in *Klebsiella pneumoniae* and Relationship with Biofilm Formation. **Society**, v. 187, n. 8, p. 2870–2880, 2005.

BANDEIRA, M. et al. Exploring Dangerous Connections between *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Healthcare-Associated Infections. **n. Mic**, p. 720–731, 2014.

BANDEIRA, M. et al. Insights on *Klebsiella pneumoniae* Biofilms Assembled on Different Surfaces Using Phenotypic and Genotypic Approaches. **Microorganisms**, v. 5, n. 2, p. 1-16, 2017.

BAO, G. et al. Genome sequence of *klebsiella oxytoca* M5al, a promising strain for nitrogen fixation and chemical production. **Genome Announcements**, v. 1, n. 1, p. 1–2, 2013.

BARRETO S, ZAMBRANO M, A. M. Phenotypic variations of susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* strains of nosocomial origin and their association with biofilm formation. **Investigación Clínica**, v. 50, n. 2, p. 221–229, 2009.

BASS, S. N. et al. Impact of combination antimicrobial therapy on mortality risk for critically ill patients with carbapenem-resistant bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 3748–3753, 2015.

BAYER, A. S.; NORMAN, D.; KIM, K. S. Efficacy of amikacin and ceftazidime in experimental aortic valve endocarditis due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, n. 6, p. 781–785, 1985.

BEGANOVIC, M. et al. Biofilm prevention concentrations (BPC) of minocycline compared to polymyxin B, meropenem, and amikacin against *Acinetobacter baumannii*. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, s/d, 2019.

BENGHEZAL, M. et al. Inhibitors of bacterial virulence identified in a surrogate host model. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1336–42, 2007.

BENGOCHEA, J. A.; SA PESSOA, J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. **FEMS Microbiology Reviews**, s/d, p. 1–22, 2018.

BERSAN, S. M. et al. Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 451, 2014.

BILCU, M. et al. Efficiency of vanilla, patchouli and ylang ylang essential oils stabilized by iron oxide@C14 nanostructures against bacterial adherence and biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* clinical strains. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17943–17956, 2014.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015.

BLOMBERG, B. et al. High rate of fatal cases of pediatric septicemia caused by Gram-negative bacteria with extended-spectrum beta-lactamases in Dar es Salaam, Tanzania. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 745–749, 2005.

BODDICKER, J. D. et al. Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 8, p. 4590–4597, 2006.

BRISSE, S.; PASSET, V.; GRIMONT, P. A D. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., a novel species isolated from human infections, with two subspecies *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 1–19, 2014.

BRISSE, S. et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. **PLoS One**, v. 4, n. 3, 2009.

BUDZYŃSKA, A. et al. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 35–41, 2011.

BURBANK, L.; MOHAMMADI, M.; ROPER, M. C. Siderophore-mediated iron acquisition influences motility and is required for full virulence of the xylem-dwelling bacterial phytopathogen *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 139–148, 2015.

BUSH, K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 10, 2018.

BUSH, K. MINIREVIEWS Characterization of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 3, p. 259–263, 1989.

BUSH, K. Bench-to-bedside review : The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. **Bush Critical Care**, v. 14, n. 224, p. 1–8, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. minireview A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995.

CABRAL, A. B. et al. Major Article among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife , Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 572–578, 2012.

CABRAL, A. B. et al. KPC-2 in *Proteus mirabilis* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 94–95, 2015.

CADAVID, E. et al. Induction of Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13884 by Several Drugs : The Possible Role of Quorum Sensing Modulation. p. 1–14, 2018.

CAMPOS, M. A. et al. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 12, p. 7107–7114, 2004.

CALIA, C. et al. Carbapenemases-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitals of two regions of Southern Italy. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 125, n. 5, p. 491–498, 2017.

CASSETTARI, V. C. et al. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit linked to onychomycosis in a healthcare worker. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 4, p. 313–316, 2006.

CASTANHEIRA, M. et al. Variations in the Occurrence of Resistance Phenotypes and Carbapenemase Genes Among Enterobacteriaceae Isolates in 20 Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program . **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, p. 23–33, 2019.

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

CERQUEIRA, S. A. et al. Persistência de *Klebsiella pneumoniae* em doentes de unidades pediátricas do Hospital de Santa Maria , em Lisboa. **Acta Pediátrica Portuguesa**, v. 42, n. 2, p. 49–53, 2011.

CHAPMAN, D. O. The Genus *Klebsiella*. **Journal of Bacteriology**, v. 51, p. 637, 1946.

CHEN, F.-J. et al. Structural and mechanical properties of *Klebsiella pneumoniae* type 3 Fimbriae. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 7, p. 1718–1725, 2011.

CHENG, H. Y. et al. RmpA regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 12, p. 3144–3158, 2010.

CHHIBBER, S.; NAG, D.; BANSAL, S. Inhibiting biofilm formation by *Klebsiella pneumoniae* B5055 using an iron antagonizing molecule and a bacteriophage. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 174, 2013.

CHO, H. et al. Bacterial cell wall biogenesis is mediated by SEDS and PBP polymerase families functioning semi-autonomously. **Nature Microbiology**, v. 1, p. 1-10, 2016.

CHONG, Y.; ITO, Y.; KAMIMURA, T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Infection**,

genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, v. 11, n. 7, p. 1499–504, 2011.

CHOUDHURY, D. X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 285, n. 5430, p. 1061–1066, 1999.

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

CHUNG, P. Y.; TOH, Y. S. Anti-biofilm agents: Recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. **Pathogens and Disease**, v. 70, n. 3, p. 231–239, 2014.

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

CLEMENTS, A. et al. The major surface-associated saccharides of *Klebsiella pneumoniae* contribute to host cell association. **PLoS One**, v. 3, n. 11, 2008.

CLSI, Clinical & Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. M100. 27^a ed., 2017.

CORONA-IZQUIERDO, F. P.; MEMBRILLO-HERNÁNDEZ, J. Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(N-morpholino)propane sulfonate (MOPS). **Research in Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 181–185, 2002.

COSTERTON, J. W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.

COSTERTON, J. W. et al. MINIREVIEW Biofilms , the Customized Microniche. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 8, p. 2137–2142, 1994.

COSTERTON, J. W.; IRVIN, R. T. The bacterial glycocalyx in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 35, p. 299–324, 1981.

CRESS, B. F. et al. Masquerading microbial pathogens: Capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 4, p. 660–697, 2014.

CRUZ-CÓRDOVA, A. et al. Hospital infantil de México pathogenic determinants of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**, v. 71, n. 1, p. 15–24, 2014.

DALMOLIN, T. V. et al. Detection and analysis of different interactions between resistance mechanisms and carbapenems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 493–498, 2017.

DE ARAUJO, C. et al. Quorum sensing affects biofilm formation through lipopolysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 595–603, 2010.

DE CAMPOS, P. A. et al. Multidrug resistance related to biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* clinical strains from different pulsotypes. **Current**

Microbiology, v. 72, n. 5, p. 617–627, 2016.

DE CARVALHO, C. C. C. R. Marine Biofilms: A Successful Microbial Strategy With Economic Implications. **Frontiers in Marine Science**, v. 5, p. 1–11, 2018.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. et al. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 5, 2014.

DE SOUZA MENDES, C.; DE SOUZA ANTUNES, A. Pipeline of Known Chemical Classes of Antibiotics. **Antibiotics**, v. 2, n. 4, p. 500–534, 2013.

DERAKHSHAN, S.; SATTARI, M.; BIGDELI, M. Effect of cumin (*Cuminum cyminum*) seed essential oil on biofilm formation and plasmid integrity of *Klebsiella pneumoniae*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 21, p. 57–61, 2010.

DI MARTINO, P. et al. Relationship between adhesion to intestinal Caco-2 cells and multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1499–503, 1997.

DIAS, A. et al. Bacilos Gram negativos produtores de β -lactamases de espectro expandido num hospital pediátrico. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, p. 197–206, 2011.

DIEP, J. K. et al. Polymyxin B and ZTI-01 (fosfomycin for injection) against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: Evaluation of activity and emergence of resistance. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 62, n. 2, 2017.

DINKELACKER, A. G. et al. Typing and Species Identification of Clinical *Klebsiella* Isolates by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 11, p.1–18. 2018.

DOI, Y.; WACHINO, J.; ARAKAWA, Y. HHS. Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 523–537, 2017.

DOMENICO, P. et al. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 10, p. 4495–4499, 1994.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

DORMAN, M. J. et al. The Capsule Regulatory Network of *Klebsiella pneumoniae* Defined by density-TraDISort. **mBio**, v. 9, n. 6, p. 1–19, 2018.

DOSLER, S.; KARAASLAN, E.; ALEV GERCEKER, A. Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. **Journal of Chemotherapy**, v. 28, n. 2, p. 95–103, 2016.

DRANCOURT, M. et al. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. **International Journal of**

Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 51, n. 3, p. 925–932, 2001.

DROPA, M. et al. Extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae isolated in a public hospital in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 4, p. 203–209, 2009.

DSOUZA, R. et al. Panel strain of *Klebsiella pneumoniae* for beta-lactam antibiotic evaluation: their phenotypic and genotypic characterization . **PeerJ**, v. 5, p. 1-15, 2017.

DUAN, H. et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental research**, v. 109, n. 5, p. 511–7, 2009.

DUGUID, J. P. Fimbriae and adhesive properties in *Klebsiella* strains. **Journal of General Microbiology**, v. 21, p. 271–286, 1959.

DUNNE, W. MICHAEL, J. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 155–166, 2002.

DURDU, B. et al. Mortality markers in nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1892, 2016.

DZUL, S. P. et al. Contribution of the *Klebsiella pneumoniae* capsule to bacterial aggregate and biofilm microstructures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1777–82, 2011.

EL FERTAS-AISSANI, R. et al. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. **Pathologie-biologie**, v. 61, n. 5, p. 209-216, 2013.

EVRARD, B. et al. Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 1, p. 210–219, 2010.

FADER, R. C. et al. Purification and chemical characterization of type 1 pili isolated. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 6, p. 3301–3305, 1981.

FADER, R. C.; DAVIS, C. P. Effect of piliation on *Klebsiella pneumoniae* infection in rat bladders. **Infection and Immunity**, v. 30, n. 2, p. 554–561, 1980.

FAVRE-BONTE, S.; JOLY, B.; FORESTIER, C. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 2, p. 554–561, 1999.

FEENSTRA, T. et al. Adhesion of *Escherichia coli* under flow conditions reveals potential novel effects of *FimH* mutations. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 3, p. 467–478, 2017.

FEIZABADI, M. M.; RAJI, N.; DELFANI, S. Identification of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 capsular types by PCR and Quellung test. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 6–9, 2013.

FERNANDES, R.; AMADOR, P.; PRUDÊNCIO, C. β -Lactams. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 7–17, 2013.

FLEMING, D.; RUMBAUGH, K. The consequences of biofilm dispersal on the host. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1–7, 2018.

FLORES, C. et al. Detection of antimicrobial resistance genes in betalactamase- and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* by patient surveillance cultures at an intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 52, n. 5, p. 284–292, 2016.

FOURIE, R. et al. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interaction, with focus on the role of eicosanoids. **Frontiers in Physiology**, v. 7, 2016.

FRAENKEL-WANDEL, Y. et al. Mortality due to *bla*KPC *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 4, p. 1083–1087, 2016.

FUMAGALLI, O. et al. N-glycosylated proteins are involved in efficient internalization of *Klebsiella pneumoniae* by cultured human epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 11, p. 4445–51, 1997.

GAD, G. F.; MOHAMED, H. A.; ASHOUR, H. M. Aminoglycoside resistance rates, phenotypes, and mechanisms of gram-negative bacteria from infected patients in upper Egypt. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. 1–7, 2011.

GALANI, I. et al. Activity of plazomicin (ACHN-490) against MDR clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Enterobacter* spp. from Athens, Greece. **Journal of Chemotherapy**, v. 24, n. 4, p. 191–194, 2012.

GALIÉ, S. et al. Biofilms in the food industry : Health aspects and control methods. v. 9, p. 1–18, 2018.

GALLANT, C. V et al. Common β -lactamases inhibit bacterial biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1012–1024, 2005.

GARCINUÑO, P. et al. Empirical monotherapy with meropenem or combination therapy : the microbiological point of view. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, n. 11, p. 1851–1855, 2016.

GARNEAU-TSODIKOVA, S.; LABBY, K. J. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. **MedChemComm**, v. 7, n. 1, p. 11–27, 2016

GARNETT, J. A. et al. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, p. 3950–3955, 2012

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049–1056, 2008.

GERLACH, G. F.; CLEGG, S.; ALLEN, B. L. Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 3, p. 1262–1270, 1989.

GHAFOURIAN, S. et al. Extended Spectrum Beta-lactamases : Definition , Classification and Epidemiology. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 17, p. 11–22, 2015.

GOLLER, C. C.; SEED, P. C. Revisiting the. n. August, p. 333–337, 2010.

GOMES, F. et al. Virulence gene expression by *Staphylococcus epidermidis* biofilm cells exposed to antibiotics. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 2, p. 191-196, 2011.

GOMEZ-SIMMONDS, A.; UHLEMANN, A. C. Clinical implications of genomic adaptation and evolution of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. Suppl 1, p. S18–S27, 2017.

GONCALVES D. S. M, DELATTRE C, BALESTRINO D, CHARBONNEL N, ELBOUTACHFAITI R, et al. Anti-Biofilm Activity: A Function of *Klebsiella pneumoniae* Capsular Polysaccharide. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. 1-12, 2014.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12ª edição. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2012, 2112 p.

GRANT, M. R. et al. Biofilm adaptation to iron availability in the presence of biotite and consequences for chemical weathering. **Geobiology**, v. 14, n. 6, p. 588–598, 2016.

GUIMARÃES, B. et al. Fatores de virulência presentes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas – UPEC para suínos. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 645–652, 2004.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GUNDOGAN, N.; YAKAR, U. A.. Siderophore production, serum resistance, hemolytic activity and extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella* species isolated from milk and milk products. **Journal of Food Safety**, v. 27, p. 251-264, 2007.

HALDORSEN, B. C. et al. Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II and AAC(6')-Ib. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 1, p. 66–69, 2014.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95–108, 2004.

HALL, C. W.; MAH, T. F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 276–301, 2017.

HANSEN, D. S. et al. Recommended test panel for differentiation of *Klebsiella* species on the

basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests. **Clinical Journal of Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3665–3669, 2004.

HELD, T. K. et al. Effects of MICs and sub-MICs of antibiotics on production of capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 5, p. 1093–1096, 1995.

HENNEQUIN, C. et al. Characterization of a DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* strain involved in an outbreak and role of the AmpR regulator in virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 288–294, 2012a.

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

HENNEQUIN, C.; FORESTIER, C. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. **Research in Microbiology**, v. 158, n. 4, p. 339–347, 2007a.

HERNÁNDEZ, J. et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002). **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 21, n. 2, p. 77–82, 2003.

HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): An emerging cause of multidrug-resistant infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. 1119–1125, 2010.

HIRSCH, E. B. et al. Assessment of antimicrobial combinations for *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 5, p. 786–793, 2012.

HORNICK, D. B. et al. Adherence properties of an *mrkD*-negative mutant of *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 5, p. 2026–2032, 1995.

JACOBY, G. A.; MUNOZ-PRICE, L. S. The New. p. 380–391, 2005.

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

HUANG, T. W. et al. Complete sequences of two plasmids in a *bla*_{TEM}-1-positive *Klebsiella oxytoca* isolate from taiwan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 4072–4076, 2013.

HUANG, T. et al. Capsule deletion via a λ -Red knockout system perturbs biofilm formation and fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 13, p. 1–8, 2014.

HUERTAS, M. G. et al. *Klebsiella pneumoniae* *yfiRNB* operon affects biofilm formation, polysaccharide production and drug susceptibility. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 160, n. 2014, p. 2595–2606, 2014.

JACOBSEN, S. M. et al. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 26–59, 2008.

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

JAMAL, M. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 1, p. 7–11, 2018.

JIANG, ERN Z.; XIANXIA HE, J. LI2. Synergy effect of meropenem-based combinations against *Acinetobacter baumannii* : a systematic review and meta-analysis. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1083–1095, 2018.

JOHNSON, J. G. et al. Type 3 fimbriae and biofilm formation are regulated by the transcriptional regulators MrkHI in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 14, p. 3453–3460, 2011.

KAPLAN, J. B. et al. Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **mBio**, v. 3, n. 4, p. 1–14, 2012.

KAVANAUGH, N. L.; RIBBECK, K. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 11, p. 4057–4061, 2012.

KAYE, K. S. et al. Agents of Last Resort. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 391–414, 2016

KHANAL, M. et al. Inhibition of type 1 fimbriae-mediated *Escherichia coli* adhesion and biofilm formation by trimeric cluster thiomannosides conjugated to diamond nanoparticles. **Nanoscale**, v. 7, n. 6, p. 2325–2335, 2015.

KIDD, T. J. et al. A *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistance mechanism that subdues host defences and promotes virulence. **EMBO Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, p. 430–447, 2017.

KIM, B. et al. Inhibitory effects of *Chrysanthemum boreale* essential oil on biofilm formation and virulence factor expression of *Streptococcus mutans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

KIM, Y. et al. Bloodstream infections by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: Epidemiology and clinical outcome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1481–1491, 2002.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Fimbrial surface display systems in bacteria: from vaccines to random libraries. **Microbiology**, v. 146 Pt 12, p. 3025–3032, 2000.

KLOPPROGGE, K. et al. Membrane association of *Klebsiella pneumoniae* NifL is affected by molecular oxygen and combined nitrogen. **Archives of Microbiology**, v. 177, n. 3, p. 223–234, 2002.

KONEMAN, Elmer W. **Konneman Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.1565 p.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 4, p. a010306, 2015.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 4, p. a010306–a010306, 1 abr. 2013.

KOUTSOLIOUTSOU, A. et al. A soxRS-constitutive mutation contributing to antibiotic resistance in a clinical isolate of *Salmonella enterica* (Serovar typhimurium). **Society**, v. 45, n. 1, p. 38–43, 2001.

KUCZYŃSKA-WIŚNIK, D. et al. Antibiotics promoting oxidative stress inhibit formation of *Escherichia coli* biofilm via indole signalling. **Research in microbiology**, v. 161, n. 10, p. 847–53, 2010.

KULENGOWSKI, B.; CLARK, J. A.; BURGESS, D. S. Killing activity of meropenem in combination with amikacin against VIM- or KPC-producing Enterobacteriaceae that are susceptible, intermediate, or resistant to amikacin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 93, n. 4, p. 372–375, 2019.

KUMAR, R. S. et al. Antibiofilm activity of *Morinda tinctoria* fruit extracts against AmpC β -lactamase positive *Klebsiella pneumoniae*. **Der Pharmacia Lettre**, v. 6, n. 1, p. 160–165, 2014.

KUMAR, A. et al. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 8, p. 481–489, 2017.

LANGSTRAAT, J.; BOHSE, M.; CLEGG, S. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5805–5812, 2001.

LE, J. et al. *In vitro* activity of carbapenems alone and in combination with amikacin against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 3, n. 3, p. 106–10, 2011.

LEE, G. C.; BURGESS, D. S. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 11, n. 1, p. 32, 2012.

LEE, H.-W. et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 1, p. 49–54, 2008.

LEIS, J. A.; RUTKA, J. A.; GOLD, W. L. Aminoglycoside-induced ototoxicity. **Canadian Medical Association Journal**, v. 187, n. 1, p. 52, 2015.

LI, X. et al. *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 54, n. Pt 6, p. 2131–2136, 2004.

LIM, T.-P. et al. Effective antibiotics in combination against extreme drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with decreased susceptibility to polymyxin B. **PloS One**, v. 6, n. 12, p. e28177, 2011.

LIM, T. P. et al. *In vitro* pharmacodynamics of various antibiotics in combination against extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2515–2524, 2015.

LIMOLI, D. H. et al. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. **Microbiol Spectrum**, v. 3, n. 3, p. 1–30, 2015.

LIN, C. T. et al. Role of the cAMP-dependent carbon catabolite repression in capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. 1–14, 2013.

LIN, J.-C. et al. Genotypes and virulence in serotype K2 *Klebsiella pneumoniae* from liver abscess and non-infectious carriers in Hong Kong, Singapore and Taiwan. **Gut Pathogens**, v. 6, n. 1, p. 21, 2014.

LIN, C. T. et al. CRP-Cyclic AMP regulates the expression of type 3 fimbriae via cyclic di-GMP in *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. 1–19, 2016.

LIN, T. H. et al. IscR regulation of type 3 fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* CG43. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 1–12, 2017.

LIN, Y.-T. et al. Bacteremic community-acquired pneumonia due to *Klebsiella pneumoniae*: clinical and microbiological characteristics in Taiwan, 2001–2008. **BMC infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. 307, 2010.

LIU, Y. et al. Capsular polysaccharide types and virulence-related traits of epidemic KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Chinese University Hospital. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 7, p. 901–907, 2017.

LIU, Y.; WANG, J.-Y.; JIANG, W. An increasing prominent disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: Etiology, diagnosis, and treatment. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2013, p. 258514, 2013.

LIVERMORE. Beta-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 557–584, 1995.

LIVERMORE, D. M. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. **The Korean journal of internal medicine**, v. 27, n. 2, p. 128–42, 2012.

LLOBET, E.; TOMÁS, J. M.; BENGOCHEA, J. A. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. **Microbiology (Reading, England)**, v. 154, n. 12, p. 3877–86, 2008.

LOPES, A. C. S. et al. bla(CTX-M-2) and bla(CTX-M-28) extended-spectrum beta-lactamase

genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 163–7, 2010.

MAATALLAH, M. et al. *Klebsiella variicola* is a frequent cause of bloodstream infection in the stockholm area, and associated with higher mortality compared to *K. pneumoniae*. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e113539, 2014.

MADIGAN, Michael T.. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128 p.

MADSEN, J. S. et al. Type 3 fimbriae encoded on plasmids are expressed from a unique promoter without affecting host motility, facilitating an exceptional phenotype that enhances conjugal plasmid transfer. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. 1–19, 2016.

MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34–39, 2001.

MAHARJAN, G. et al. Catheter-associated urinary tract infection and obstinate biofilm producers. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, 2018: 7624857, 2018.

MARCH, C. et al. Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. **PloS One**, v. 8, n. 2, p. e56847, 2013.

MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 1–15, 2018.

MARTÍNEZ, J. et al. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 261–268, 2004.

MARTINEZ, J. J. et al. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 12, p. 2803–2812, 2000.

MATATOV, R. et al. Inability of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* to assemble functional type 1 fimbriae on their surface. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 1, p. 123–130, 1999.

MATSEN, J. M.; SPINDLER, J. A; BLOSSER, R. O. Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. **Applied microbiology**, v. 28, n. 4, p. 672–8, out. 1974.

MELETIS, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 3, n. 1, p. 15–21, 2015.

MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: Activity and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 727–737, 1999.

MOORE, R. et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: an emerging infection in Ireland and Europe. **Infection**, v. 41, n. 3, p. 681–686, 2013.

MORADIGARAVAND, D. et al. Defining thresholds for abnormal premature progesterone levels during ovarian stimulation for assisted reproduction technologies. **Fertility and Sterility**, v. 110, n. 4, p. 671–679, 2018.

MORANTA, D. et al. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of beta-defensins by airway epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 78, n. 3, p. 1135–46, 2010.

MOSHIRI, J. et al. Identification of a small molecule anti-biofilm agent against *Salmonella enterica*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–11, 2018.

MURPHY, C. N.; CLEGG, S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. **Future microbiology**, v. 7, n. 8, p. 991–1002, 2012.

MURPHY, C. N. et al. Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 8, p. 3009–3017, 2013.

NAAS, T. et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *blaKPC* gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1257–1263, 2008.

OELSCHLAEGER, T. A; TALL, B. D. Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 7, p. 2950–2958, 1997.

OFEK, I.; HASTY, D. L.; SHARON, N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 181–191, 2003.

OLIVEIRA, G. et al. Chemical composition and efficacy in the egg-hatching inhibition of essential oil of *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* from sheep. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 3, p. 288–292, 2014.

ONG, C.-L. Y. et al. Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 3, p. 1054–1063, 2008.

OU, Q. et al. Involvement of cAMP receptor protein in biofilm formation, fimbria production, capsular polysaccharide biosynthesis and lethality in mouse of *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 causing pyogenic liver abscess. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 1–7, 2017.

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

PAN, Y.-J. et al. Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2231–2240, 2008.

PARRINO, B. et al. Synthetic small molecules as anti-biofilm agents in the struggle against antibiotic resistance. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 161, p. 154–178, 2019.

PEFANIS, A. et al. Efficacy of ceftazidime and aztreonam alone or in combination with amikacin in experimental left-sided *Pseudomonas aeruginosa* endocarditis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 37, n. 2, p. 308–313, 1993.

PERCIVAL, S. L.; WILLIAMS, D. W. Biofilms in infection prevention and control biofilms in infection prevention and control. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 323–334, 2015.

PEREIRA, C. S.; THOMPSON, J. A.; XAVIER, K. B. AI-2-mediated signalling in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 2, p. 156–181, 2013.

PEREZ, F. et al. Polymyxins: To Combine or Not to Combine? **Antibiotics**, v. 8, n. 2, p. 38, 2019.

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. 371–379, 2010.

PLETZER, D.; HANCOCK, R. E. W. Antibiofilm Peptides: Potential as Broad-Spectrum Agents. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 19, p. 2572–2578, 2016.

PODSCHUN, R. et al. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3325–3327, 2001.

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

POOLE, K. Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 227–234, 2012.

POTTER, R. F.; D'SOUZA, A. W.; DANTAS, G. The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Drug Resistance Updates**, v. 29, p. 30–46, nov. 2016.

POURNARAS, S. et al. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae strains by time-kill assay. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 3, p. 244–247, 2011.

PUCCI, M. J.; BUSH, K. Investigational antimicrobial agents of 2013. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 792–821, 2013.

QAYYUM, S.; OVES, M.; KHAN, A. U. Obliteration of bacterial growth and biofilm through ROS generation by facilely synthesized green silver nanoparticles. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. 1–18, 2017.

QUEENAN, A. M. et al. Hydrolysis and inhibition profiles of beta-lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 565–569, 2010.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.

QUINTAS, V. et al. Antiplate effect of essential oils and 0.2% chlorhexidine on an *in situ* model of oral biofilm growth: A randomised clinical trial. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0117177, 2015.

QURESHI, Z. A. et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: Superiority of combination antimicrobial regimens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 2108–2113, 2012.

RABIN, N. et al. Medicinal Chemistry Agents that inhibit bacterial biofilm formation. **Future Med. Chem**, v. 7, n. 5, p. 647–671, 2015.

RAHIM, K.; MOHAMED, A. Prevalence of Extended Spectrum β -lactamase-Producing *Klebsiella pneumonia* in Clinical Isolates. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1–5, 2014.

RAHIM, N. A. et al. Synergistic killing of NDM-producing MDR *Klebsiella pneumoniae* by two “old” antibiotics-polymyxin B and chloramphenicol. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 9, p. 2589–2597, 2015.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 151–171, 2011.

RAMIREZ, M.; TOLMASKY, M. Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects for Inhibition. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 1-23, 2017.

RAMOS-CASTAÑEDA, J. A. et al. Mortality due to KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: Systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection**, v. 76, n. 5, p. 438–448, 2018.

RASKO, D. A; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews. Drug discovery**, v. 9, n. 2, p. 117–128, 2010.

REGUÉ, M. et al. A Gene, *uge*, is essential for *Klebsiella pneumoniae* Virulence. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 54-61, 2004.

RENDÓN, M. A et al. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 10637–10642, 2007.

RENDUELES, O.; KAPLAN, J. B.; GHIGO, J. M. Antibiofilm polysaccharides. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 334–346, 2013.

ROBERTS, I. S. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 285–315, 1996.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M. et al. Asociación en un mismo plásmido de *bla*VIM-1 y *qnr*S2 en *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* aisladas en Sevilla. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 5, p. 246–248, 2012.

- ROSEN, D. A et al. Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* *FimH* affect function and pathogenesis in the urinary tract. **Infection and immunity**, v. 76, n. 7, p. 3346–56, jul. 2008.
- ROSEN, D. A. et al. *Klebsiella pneumoniae* FimK promotes virulence in murine pneumonia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 4, p. 649–658, 2016.
- ROSENBLUETH, M. et al. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 27–35, 2004.
- ROSSI, C. et al. Influence of incubation conditions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* isolated from dairy products and dairy manufacturing plants. **Italian Journal of Food Safety**, v. 5, n. 3, 2016.
- ROY, R. et al. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 522–554, 2018.
- SADEKUZZAMAN, M. et al. Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 4, p. 491–509, 2015.
- SAHA, R. et al. *Klebsiella michiganensis* sp. nov., a new bacterium isolated from a tooth brush holder. **Current Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 72–78, 2013.
- SAHLY, H. et al. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 12, p. 6744–6749, 2000.
- SAHLY, H. et al. Extended-spectrum beta-lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3029–3034, 2008.
- SAMBANTHAMOORTHY, K. et al. Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.
- SAMBROOK, J., MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. Molecular cloning: a laboratory manual. 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANTOS, A. F. et al. Evaluation of MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 3, p. 191–197, 2013.
- SATLIN, M. J.; WALSH, T. J. Multidrug-resistant Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, and vancomycin-resistant Enterococcus: Three major threats to hematopoietic stem cell transplant recipients. **Transplant Infectious Disease**, v. 19, n. 6, p. e12762, dez. 2017.
- SATO, T. et al. Mechanism of resistance and antibacterial susceptibility in extended-spectrum β -lactamase phenotype *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolated between 2000 and 2010 in Japan. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 2015, p. 538–543, 2015.

SATO, Y. et al. Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **PLoS One**, v. 13, n. 3, p. e0194556, 2018.

SCAVUZZI, A. M. L. et al. Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla KPC-2 gene. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 1370–1377, 2016.

SCHAFFER, J. N.; PEARSON, M. M. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 5, p. 212–263, 2015.

SCHEMBRI, M. A. et al. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. **American Society for Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 4626–4633, 2005.

SCHILLACI, D. et al. *In vitro* anti-biofilm activity of *Boswellia* spp. oleogum resin essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 433–438, 2008.

SCHROLL, C. et al. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. **BMC microbiology**, v. 10, p. 179, 2010.

SEIBERT, G. et al. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. **Einstein (São Paulo)**, v. 12, n. 3, p. 282–286, 2014.

SEIFI, K. et al. Evaluation of biofilm formation among *Klebsiella pneumoniae* isolates and molecular characterization by ERIC-PCR. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 2–7, 2016.

SHAEER, K. M. et al. Plazomicin: A Next-Generation Aminoglycoside. **Pharmacotherapy**, v. 39, n. 1, p. 77–93, 2019.

SHARON, N. Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. **FEBS letters**, v. 217, n. 2, p. 145–57, 1987.

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

SINGH, R. et al. Penetration barrier contributes to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics, and exhibits genus-, strain- and antibiotic-specific differences. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 6, p. 1–6, 2016.

SINGH, S. et al. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 53–62, 2017.

SINGHAI, M. et al. A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 193–8, 2012.

SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-16, 2015.

SINGLA, S.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S. Susceptibility of different phases of biofilm of

Klebsiella pneumoniae to three different antibiotics. **Journal of Antibiotics**, v. 66, n. 2, p. 61–66, 2013.

SOLANO, C.; ECHEVERZ, M.; LASA, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 96–104, 2014

SRINIVAS, P.; RIVARD, K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. **Current Infectious Disease Reports**, v. 19, p. 1–38, 2017.

STAHLHUT, S. G. et al. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 350–9, 2012.

STAHLHUT, S. G. et al. Structural and population characterization of *MrkD*, the adhesive subunit of type 3 fimbriae. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 24, p. 5602–5613, 2013.

STANDISH, A. J. et al. Chemical inhibition of bacterial protein tyrosine phosphatase suppresses capsule production. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. e36312, 2012.

STEINMANN, J. et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. **Euro Surveillance**, v. 16, n. 33, p. 1–6, 2011.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891–899, ago. 2007.

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

STRUVE, C.; BOJER, M.; KROGFELT, K. A. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 4055–4065, 2008.

STRUVE, C.; BOJER, M.; KROGFELT, K. A. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 11, p. 5016–5024, 2009.

SUBRAMANIAN, P. et al. Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. **The Australasian Medical Journal**, v. 5, n. 7, p. 344–648, 2012.

SUBRAMANIAN, P. et al. Determination of correlation between biofilm and extended spectrum β lactamases producers of Enterobacteriaceae. v. 2, n. 1, p. 2–6, 2015.

SUGIMOTO, S. et al. Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. **Scientific**

Reports, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

SUN, S. et al. The metabolic flux regulation of *Klebsiella pneumoniae* based on quorum sensing system. **Scientific Reports**, v. 6, n. December, p. 1–9, 2016.

SURGERS, L. et al. ESBL-Producing Strain of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* K2, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 9, p. 1687–1688, set. 2016.

TÄNGDÉN, T. et al. Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by *in vitro* time-kill experiments. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1757–1762, 2014.

TARKKANEN, A. M. et al. Fimbriation, capsulation, and iron-scavenging systems of *Klebsiella* strains associated with human urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 3, p. 1187–1192, 1992.

TARKKANEN, A. M. et al. Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 4, p. 1546–1549, 1997.

TCHESNOKOVA, V. et al. Type 1 fimbrial adhesin FimH Elicits an immune response that enhances cell adhesion of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 10, p. 3895–3904, 2011.

TEMME, K.; ZHAO, D.; VOIGT, C. A. Refactoring the nitrogen fixation gene cluster from *Klebsiella oxytoca*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 18, p. 7085–7090, 2012.

TEO, J. et al. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Thai hospital: a molecular epidemiologic analysis and identification of bactericidal polymyxin B-based combinations. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 4, p. 1–7, 2015.

THOMEN, P. et al. Bacterial biofilm under flow: First a physical struggle to stay, then a matter of breathing. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. e0175197, 12 abr. 2017.

TOLENTINO, F. M. et al. Endemicity of the High-Risk Clone *Klebsiella pneumoniae* ST340 Coproducing QnrB, CTX-M-15, and KPC-2 in a Brazilian Hospital. **Microbial Drug Resistance**, v. 00, n. 00, p. 1–10, 2018.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio (Ed.). **Microbiologia**. 6.ed. São Paulo: Atheneu, 2015. 920 p.

TRENTIN, D. S. et al. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66257, 2013.

TUMBARELLO, M. et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: Differences in therapy and mortality in a multicentre study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 7, p. 2133–2143, 2015.

TZOUVELEKIS, L. S. et al. Treating infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 9, p. 862–872, 2014.

VAN LAAR, T. A. et al. Sublethal concentrations of carbapenems alter cell morphology and genomic expression of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 1707–1717, 2015.

VOUILLAMOZ, J. et al. *In vitro* activities of tigecycline combined with other antimicrobials against multiresistant Gram-positive and Gram-negative pathogens. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 371–374, 2008.

VUOTTO, C. et al. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. **pathogens**, v. 3, p. 743–758, 2014.

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

WACHINO, J.; ARAKAWA, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update. **Drug Resistance Updates**, v. 15, n. 3, p. 133–148, 2012.

WANG, H. et al. Nanomechanics measurements of live bacteria reveal a mechanism for bacterial cell protection: the polysaccharide capsule in *Klebsiella* is a responsive polymer hydrogel that adapts to osmotic stress. **Soft Matter**, v. 9, n. 31, p. 7560–7567, 2013a.

WANG, H. et al. Increased biofilm formation ability in *Klebsiella pneumoniae* after short-term exposure to a simulated microgravity environment. **Microbiology Open**, v. 5, n. 5, p. 793–801, 2016a.

WANG, H. et al. Influence of fimbriae on bacterial adhesion and viscoelasticity and correlations of the two properties with biofilm formation. **Langmuir**, v. 33, n. 1, p. 100–106, 2017a.

WANG, R. et al. Synergism of fused bicyclic 2-aminothiazolyl compounds with polymyxin B against *Klebsiella*. **Medicinal Chemistry Communication**, v. 8, n. 11, p. 2060–2066, 2017b.

WANG, X. et al. Rapid method of *luxS* and *pfs* gene inactivation in enterotoxigenic *Escherichia coli* and the effect on biofilm formation. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 1, p. 257–264, 2016b.

WANG, Z. C. et al. Fimk regulation on the expression of type 1 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* CG43S3. **Microbiology**, v. 159, pt 7, p. 1402–1415, 2013b.

WARGO, K. A.; EDWARDS, J. D. Aminoglycoside-Induced Nephrotoxicity. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 27, n. 6, p. 573–577, 2014.

WEBB, J. S.; GIVSKOV, M.; KJELLEBERG, S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 578–585, dez. 2003.

WHITFIELD, C. Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*.

Annual Review of Biochemistry, v. 75, n. 1, p. 39–68, 2006.

WILKSCH, J. J. et al. MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 8, p. e1002204, 2011.

WITKOWSKA, D. et al. Major structural proteins of type 1 and type 3 *Klebsiella* fimbriae are effective protein carriers and immunogens in conjugates as revealed from their immunochemical characterization. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 221–230, 2005.

WOJNICZ, D.; TICHACZEK-GOSKA, D. Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin, amikacin and colistin on biofilm formation and virulence factors of *Escherichia coli* planktonic and biofilm forms isolated from human urine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 259–265, 2013.

WU, C.-C. et al. Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* KPC fimbriae by the site-specific recombinase KPC I. **Microbiology**, v. 156, n. pt 7, p. 1983–92, 2010.

WU, H. et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2015.

WU, M.-C. et al. Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess. **PloS One**, v. 6, n. 8, p. e23500, 2011.

WU, Y.; OUTTEN, F. W. IscR controls iron-dependent biofilm formation in *Escherichia coli* by regulating type I fimbria expression. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 4, p. 1248–1257, 2009.

XU, J. et al. *Klebsiella alba* sp. nov., a novel pesticide-tolerant bacterium from a heavily polluted environment. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 247, n. 56, p. 241–247, 2010.

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

YASIN, F. et al. Combination Therapy for Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Urinary Tract Infection. **Cureus**, v. 9, n. 7, p. 1–8, 22 jul. 2017.

YAWATA, Y.; NGUYEN, J.; STOCKER, R. Microfluidic studies of biofilm formation in dynamic environments. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 19, p. 2589–2595, 2016.

YE, Y. et al. Mechanism for carbapenem resistance of clinical Enterobacteriaceae isolates. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, p. 1143–1149, 2018.

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.

ZHAN, L. et al. Outbreak by Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* ST11 Isolates with Carbapenem Resistance in a Tertiary Hospital in China. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 182, p. 1–9, 2017.

ZHENG, J. et al. Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of wcaG. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 21, 2018.

ZIMMER, K. R. et al. The antibiofilm effect of blueberry fruit cultivars against *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 3, p. 324–331, 2014.

ZOTTOLA, E. A; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry--should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 125–48, 1994.

ZUBERI, A.; MISBA, L.; KHAN, A. U. CRISPR Interference (CRISPRi) inhibition of luxS gene expression in *E. coli*: An approach to inhibit biofilm. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 214, 2017.

APÊNDICE A – ARTIGO 1 SUBMETIDO À ACTA TRÓPICA

Manuscript Details

Manuscript number	ACTROP_2019_159
Title	Presence of virulence genes and biofilm formation in clinical isolates of <i>Klebsiella pneumoniae</i> carriers and non-carriers of the blaKPC-2 gene in Pernambuco, Brazil
Article type	Research Paper

Abstract

Klebsiella pneumoniae is considered an important opportunistic multidrug-resistant pathogen. The aim of this study was to determine the capacity of biofilm formation and the occurrence of virulence genes related to *K. pneumoniae* isolates, carriers or not carriers of the blaKPC gene. For the accomplishment of the present study, was made the susceptibility testing of all isolates by the Vitek-2 and the confirmation of the *K. pneumoniae* species was done by MALDI – TOF. The polymerase chain reaction (PCR) was performed for the genotypic detection of the blaKPC gene and the virulence genes *cps*, *fimH*, *mrkA*, *mrkD*, *ecpA*. For the determination of the clonal profile among the isolates, the ERIK-PCR technique was performed. The isolates had a multidrug-resistance profile, where all of them presented resistance to 3rd generation cephalosporins and all were sensitive to polymyxin B. Between the isolates analyzed, 45% (18/40) were classified as KPC producers being blaKPC-2. Among 40 isolates, 38 were able to form biofilm, most of them classified as strong formers. The isolates carrying the blaKPC-2 gene showed a higher frequency of the virulence genes presenting a strong relation with the biofilm formation. Dendrogram analysis classified the isolates of *K. pneumoniae* in 37 genetic groups, where 3 pairs had strongly similar clonal profiles. The presence of a clone was identified in different hospitals of Recife-PE, Brazil. In conclusion, this study confirms the genetic heterogeneity in the isolates of *K. pneumoniae* and that there is a direct relationship between the presence of the virulence genes studied and the biofilm formation

Keywords	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , biofilm, blaKPC, resistance gene, virulence gene.
Corresponding Author	Luiz Alves
Corresponding Author's Institution	Institute Aggeu Magalhães
Order of Authors	Luiz Alves, Catarina Fernandes de Freitas, Grasielle Vaz da Silva Vaz da Silva, Fernanda Cristina Gomes de Lima, Jorge Belém Oliveira Junior, Dyana Leal Veras, Ana Paula Família, Fábio André Brayner
Suggested reviewers	Marília Cavalcanti, Thiago Matos-Rocha, Ana Catarina Lopes

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover Letter.doc [Cover Letter]

Highlighth.doc [Highlights]

Graphical abstract.doc [Graphical Abstract]

Manuscript.doc [Manuscript File]

Figure 1.doc [Figure]

Table 1.doc [Table]

Table 2.doc [Table]

Table 3.doc [Table]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

APÊNDICE B – ARTIGO 2 SUBMETIDO À MICRON

Manuscript Details

Manuscript number	JMIC_2019_53
Title	Impact of inhibitory concentrations of antimicrobials on <i>Klebsiella pneumoniae</i> biofilm: effect on formation, ultrastructure, expression of blaKPC and biofilm related genes
Article type	Full Length Article

Abstract

Klebsiella pneumoniae has become an important pathogen causing approximately 14 to 20% of healthcare-related infections. It is known that in *K. pneumoniae* some of the virulence genes detected are also related to biofilm production and as described in the literature, concentrations inhibition of antimicrobial agents may interfere with the expression of these genes and consequently in the production of the biofilm. This study investigated the action of sub-minimum inhibitory concentration (sub-MICs) of the antimicrobial agents amikacin, polymyxin B and meropenem, alone and in combinations in the formation of biofilm by *K. pneumoniae*, ultrastructural alterations of the biofilms and in the expression of the resistance gene blaKPC and the genes of virulence LuxS, mrkD, mrkA, ecpA. The 10 isolates of *K. pneumoniae* and blaKPC producers were able to form biofilms on microplates by the crystal violet method. All isolates were sensitive to amikacin and polymyxin B, and only one isolate sensitive to meropenem when evaluated by the Mueller-Hinton broth microdilution technique. Three isolates showed a synergistic effect in the two antimicrobial associations (amikacin + meropenem and polymyxin B + meropenem) evaluated by Checkerboard. Through PCR it was possible to observe that the sub-MICs of the antimicrobials alone and in combination interfered in a varied way for the three isolates in the expression of the blaKPC gene and in the genes related to the biofilm. In addition, the ultrastructure of the biofilms formed by the k07, k94 and k870 isolates and treated with the antimicrobials had varied profiles when evaluated by scanning electron microscopy.

Keywords	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; biofilm; antimicrobial; blaKPC
Manuscript category	Filip Braet - Biological Science
Corresponding Author	Luiz Alves
Corresponding Author's Institution	Institute Aggeu Magalhães
Order of Authors	Luiz Alves, Catarina Fernandes Freitas, Graciele Vaz Silva, Fernanda Cristina Gomes Lima, Jorge Belém Oliveira Junior, Dyana Leal Veras, Ana Paula Família, Fábio André Brayner
Suggested reviewers	Lânia Ferreira Silva, Gláucia Lima, Marília Cavalcanti, Thiago Rocha