

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**Deteccção de mecanismos de resistência, propriedades adesivas e
capacidade de formação de biofilmes de *Klebsiella pneumoniae*
multirresistentes**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carlos Hugo Del Priore Winckler Neto

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

Deteção de mecanismos de resistência, propriedades adesivas e capacidade de formação de biofilmes de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes

Carlos Hugo Del Priore Winckler Neto

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof. (Dra) Marli Matiko Anraku Campos
Co-Orientador: Prof. (Dr) Roberto Christ Vianna Santos

Santa Maria, RS, Brasil
2013

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**Deteção de mecanismos de resistência, propriedades adesivas e
capacidade de formação de biofilmes de *Klebsiella pneumoniae*
multirresistentes**

elaborada por
Carlos Hugo Del Priore Winckler Neto

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Marli Matiko Anraku Campos, Dra.
(Presidente/Orientador)**

Priscila de Arruda Trindade, Dra. (UNIPAMPA)

Solange Cristina da Silva Martins, Dra. (UNIFRA)

Santa Maria, 28 de Março de 2013

Dedico este trabalho...

... Aos meus pais, Renato e Marliza, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

... Ao meu irmão João Carlos, pelo companheirismo.

... Ao meu filho Eduardo Henrique, por ser uma das razões do meu viver.

... À minha namorada Bruna, pelo amor, incentivo e sempre acreditar que sou capaz de alcançar todos os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

“Deus, te agradeço por tudo. Por me ajudar a seguir, me fazer crescer, abrir meus olhos para o mundo. Por cada dia, por cada vez que eu me refaço. Por cada sonho, que se tornou realidade. Por me mostrar cada verdade. Por estar sempre em meu caminho. Por tanta luz, tanto amor, tantas alegrias, tanta força. Por cada passo que eu dou. Por minha família. Eu te agradeço senhor.”

Aos meus amados pais, Renato e Marliza, por estarem sempre ao meu lado me protegendo e incentivando. Obrigado por todo esforço e educação recebida. Obrigado pelos exemplos de vida, persistência, amor e bondade. Amo vocês.

Ao meu irmão João Carlos, obrigado pelas palavras de tranquilidade que me ajudaram a seguir.

Ao meu filho Eduardo Henrique, por seu amor incondicional e ser quem me dá forças para seguir em frente a cada dia que passa.

A minha namorada Bruna, por todos os momentos que passamos juntos e por todos que ainda virão. Obrigado por tanta força para seguir em frente, tanto amor, compreensão, paciência e confiança, enfim, por estar sempre em meu caminho. A esta pessoa maravilhosa meus sentimentos com palavras não caberiam nesta dissertação.

A dois amigos fantásticos, Rose Maria e Júlio, obrigado pelo carinho e acolhida com tanto amor.

Aos meus tios queridos, Francisco e Marli por sempre me acolherem com carinho e amor. Assim como meus pais vocês são exemplos de vida e perseverança, com certeza fizeram parte da minha formação.

Ao meu primo Vitor Ângelo, pelo companheirismo e amizade.

A toda minha família, pela união em todas as horas. Obrigada por acreditarem em mim.

A minha orientadora Marli Matiko Anraku Campos, pela aposta, incentivo e confiança.

Ao meu co-orientador Roberto Christ Vianna Santos, por sua ímpolita reputação e profunda sabedoria, paciência, confiança e todos os ensinamentos. Um verdadeiro amigo. A você, meu respeito e gratidão por tudo que me ensinou!

Aos amigos, colegas e professores do laboratório de microbiologia da UFSM e do laboratório de microbiologia e biologia molecular da UNIFRA, pela atenção, dedicação, carinho e companheirismo.

A todos colegas de trabalho do Laboratório Oswaldo Cruz, pela ajuda, apoio e amizade.

Aos meus colegas, Renata e Rafael, pela ajuda, apoio e amizade.

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas que proporcionaram a minha formação.

A banca examinadora, por aceitarem o convite e pelas contribuições que farão a este trabalho.

A todos que participaram deste trabalho de alguma forma, meu muito obrigado.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

Deteção de mecanismos de resistência, propriedades adesivas e capacidade de formação de biofilmes de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes

Autor: Carlos Hugo Del Priore Winckler Neto
Orientadora: Prof. (Dra) Marli Matiko Anraku Campos
Co-Orientador: Prof. (Dr) Roberto Christ Vianna Santos
Data e local de Defesa: Santa Maria, 28 de Março de 2013.

Durante as últimas décadas, a *Klebsiella pneumoniae* tem emergido como um dos patógenos mais importantes clinicamente, especialmente em função da alta prevalência de amostras produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases. As opções terapêuticas para o tratamento destas infecções são limitadas não somente por esta produção enzimática, mas também pela frequente capacidade de formação de biofilmes. O estabelecimento de biofilmes de *K. pneumoniae* sobre tecidos do hospedeiro acaba por proteger os microrganismos da ação de agentes antimicrobianos e da resposta imunológica, além de conduzir a expressão de determinantes de virulência. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi detectar mecanismos de resistência, propriedades adesivas e capacidade de formação de biofilmes de isolados clínicos de *K. pneumoniae* multirresistentes. Na primeira fase deste estudo, foram isoladas 33 isolados clínicos de *K. pneumoniae* com perfil de sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos. Através de testes fenotípicos foram detectadas 10 amostras que apresentaram positividade para o teste modificado de Hodge (MHT) sugerindo produção de carbapenemases e duas amostras que apresentaram positividade para o teste sinérgico com ácido borônico (AB), indicando produção de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). Quando utilizado ferramentas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase, não foi detectado o gene bla_{KPC}, caracterizando desta forma uma falha na detecção fenotípica de KPC. Na segunda fase deste estudo, foram analisadas 14 amostras de *K. pneumoniae* multirresistentes a fim de verificar a capacidade de formação de biofilmes, bem como propriedades adesivas/agregativas. A maioria das isolados clínicos analisadas apresentaram baixa afinidade ao xileno, sugerindo um caráter hidrofílico, além de alta afinidade ao solvente básico acetato de etila – indicando características superficiais ácidas. Foi verificado ainda que os isolados clínicos estudados apresentaram alta capacidade de formação de biofilme e importante adesão em células epiteliais. As combinações de todas estas características estudadas podem contribuir para a sobrevivência de *K. pneumoniae* no hospedeiro e no ambiente, pois a organização dos microrganismos em biofilme dificulta o tratamento farmacológico e favorece a sua disseminação e multirresistência.

Palavras-chaves: *Klebsiella pneumoniae*, KPC, Hidrofobicidade, Biofilmes

ABSTRACT

Master Dissertation

Programme of Post Graduation in Pharmaceutical Sciences

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

Detection of mechanisms of resistance, adhesive properties and ability of multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* to form biofilms

Author: Carlos Hugo Del Priore Winckler Neto

Oriented by: Prof. (Dra) Marli Matiko Anraku Campos

Co-oriented by: Prof. (Dr) Roberto Christ Vianna Santos

Date and place of the defense: Santa Maria, March 28, 2013

During the last decades, *K. pneumoniae* has emerged as one of the most clinically significant pathogens, especially due to the high prevalence of strains producing extended spectrum β -lactamases (ESBL) and carbapenemases. The therapeutic options to treat these infections are constrained not only by this enzyme production, but also by the regular ability to form biofilms. The development of *K. pneumoniae* biofilms on the host tissue eventually protect the microorganisms from the action of antimicrobial agents and from the immune response, apart from driving the expression of virulence factors. Thus, the aim of this study was to detect mechanisms of resistance, adhesive properties and ability of multi-resistant *K. pneumoniae* clinical isolates to form biofilms. In the first stage of the study, 33 strains of *K. pneumoniae* with reduced susceptibility to carbapenems were isolated. By using phenotypic tests, 10 samples positive for the modified Hodge test were detected, suggesting the production of carbapenemases, and 2 strains manifested positivity for the synergic test with boronic acid, suggesting the production of KPC. When employing molecular techniques, such as polymerase chain reaction, the gene bla_{KPC} was not detected, characterizing failure on the phenotypic detection of KPC. In the second stage of the study, 14 strains of multi-resistant *K. pneumoniae* were analyzed in order to verify the ability of biofilm formation, as well as adhesive/aggregative properties. Most of the strains analyzed presented low affinity to p-xylene, suggesting hydrophilic character, aside from strong affinity to the basic solvent ethyl acetate – indicating acidic surface characteristics. It was also verified that the strains studied manifested high ability of biofilm formation and important adhesion in epithelial cells. The combination of all the characteristics studied may contribute to the survival of *K. pneumoniae* in the host and in the environment, as the organization of microorganisms in biofilms complicates the pharmacological treatment and favors its spread and multi-resistance.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, KPC, Hydrophobicity, Biofilms

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO II

Tabela 1 - Relationships between aggregation state, hydrophobicity, slime production, adherence state and adherence to epithelial cells.....	49
Tabela 2 – Surface hydrophobicity (%) of <i>K. pneumoniae</i> strains.....	50

LISTA DE FIGURAS

MANUSCRITO II

Figura 1 - Biofilm forming ability of multiresistant *K. pneumoniae* strains.....52

Figura 2- Autoaggregative profile of multiresistant *K. pneumoniae* strains.....53

Figura 3- Number of adhered bacteria per 100 Buccal Epithelial Cells.....54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
1.2 Mecanismos de resistência.....	14
1.3 Biofilme	19
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 MANUSCRITOS.....	23
3.1 Manuscrito I	24
3.2 Manuscrito II	33
4 DISCUSSÕES.....	55
5 CONCLUSÃO	59
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
7 ANEXOS	65
7.1 Anexo A – comprovante de submissão de manuscrito I para revista Brazilian Journal of Microbiology	65
7.2 Anexo B - Comprovante de submissão de manuscrito II para revista The Brazilian Journal of Infectious Diseases.....	66

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está organizada na seguinte forma: primeiramente são apresentadas a introdução e os objetivos. A seguir, os métodos, resultados, discussão e conclusões são apresentadas na forma de dois manuscritos, os quais foram escritos, seguindo as normas dos periódicos aos quais os mesmos foram submetidos à publicação. Os itens discussão e conclusões finais da dissertação são apresentados após o manuscrito II. As referências bibliográficas apresentadas no final da dissertação referem-se às citações que aparecem nos itens introdução e discussão. A formatação atende a MDT de 2012 da UFSM.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Klebsiella pneumoniae*

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por um grupo grande e heterogêneo de bacilos Gram-negativos. Os principais gêneros desta família são *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter* e *Serratia* (ROLLINS & JOSEPH, 2000). O gênero *Klebsiella* foi assim designado por Trevisan em 1885, em homenagem a Edwin Klebs, microbiologista alemão. Trevisan também foi responsável pela descrição da espécie *K. pneumoniae* (MARTINEZ et al., 2004). Historicamente a classificação das espécies de *Klebsiella* foi baseada em suas características patogênicas ou quanto a sua origem. Posteriormente foram classificadas de acordo com suas características relativas à utilização de diferentes substratos e atividades enzimáticas.

Os estudos de biologia molecular permitiram a identificação de novas espécies e a reclassificação das já existentes, alterando a taxonomia do gênero *Klebsiella*. Este gênero foi definido por sequenciamento do ácido desoxirribonucleico (DNA) e permitiu a identificação de cinco espécies: *K. oxytoca*; *K. planticola*; *K. terrigena*, *K. mobilis* e *K. pneumoniae*. Esta última é subclassificada em três subespécies: *Klebsiella pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subespécie *ozaenae* e *Klebsiella pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis* (PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

A *K. pneumoniae* é um aeróbio facultativo, não esporulado, cujo tamanho varia de 0,3 a 1 μ de diâmetro e 0,6 a 6 μ de comprimento, é imóvel e produz colônias grandes e gomosas. No ágar MacConkey, produz colônias róseas, brilhantes, com aspecto elevado e de consistência mucóide. As colônias formadas são grandes devido à cápsula mucóide polissacarídica (Antígeno K) que protege o microrganismo contra a fagocitose por granulócitos, contra a ação de fatores bactericidas do soro e ainda tem função auxiliar na aderência (MARTÍNEZ et al., 2004).

O gênero *Klebsiella* possui características bioquímicas que permitem sua identificação. Apresenta reação de oxidase negativa, fermenta glicose, reduz nitrato, lisina positiva, indol negativo, produz gás, ornitina negativa, metaboliza a lactose,

utiliza o citrato como fonte de carbono e também hidrolisa a uréia, formando gás ou não. A maioria das amostras é capaz de produzir o butilenoglicol como produto final da fermentação da glicose (VERSALOVIC et al., 2011).

A *Klebsiella spp.* é um patógeno frequentemente associado a patologias graves, proporcionando altas taxas de morbi-mortalidade. Além disto, estes microrganismos normalmente estão relacionados a infecções nosocomiais. Pacientes hospitalizados imunodeprimidos com doença subjacente, como por exemplo, a *diabetes mellitus* ou obstrução pulmonar crônica são os principais alvos destes microrganismos. Nestes pacientes a *Klebsiella spp.* pode originar doenças graves, como sepse, pneumonia, infecções do trato urinário e infecção dos tecidos moles. A incidência de infecções causadas por *Klebsiella spp.* é de 5 a 7% de todas as infecções adquiridas no hospital classificando-se entre os oito mais importantes agentes infecciosos nestes ambientes. A espécie de maior relevância clínica dentro do gênero é a *Klebsiella pneumoniae* (PODSCHUN e ULLMAN, 1998).

A *K. pneumoniae* é um microrganismo notório por sua capacidade de acumulação e transferência de determinantes de resistência (WOODFORD et al., 2008; RASHEED et al., 2008; WEI et al., 2007; MOLAND et al., 2003). Estudos de vigilância de resistência aos antimicrobianos em ambiente hospitalar mostram que na América Latina a resistência em Gram-negativos é mais preocupante que em Gram-positivos (SADER et al., 2004). Neste contexto, a *K. pneumoniae* tem um papel de destaque como agente infeccioso em nosso meio.

1.2 Mecanismos de Resistência

As infecções causadas por microrganismos resistentes aos antinicrobianos representam um aumento significativo na falha terapêutica, morbidade e mortalidade em comparação com infecções causadas por microrganismos sensíveis. Esse acaba sendo um fator crítico para o gerenciamento do tratamento de pacientes com infecções por estes microrganismos (QUEENAN & BUSH 2007).

Nos Estados Unidos da América, os custos anuais adicionais associados a infecções causadas por microrganismos resistentes, em comparação com microrganismos sensíveis são estimados entre 21 a 34 bilhões de dólares americanos. A Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA) reconhece a resistência aos antimicrobianos como uma das maiores ameaças para a saúde

humana em todo o mundo (SPELLBERG et al., 2011). Além disso, a resistência antimicrobiana foi o foco do Dia Mundial da Saúde em 2011 da Organização Mundial de Saúde (OMS). O impacto da resistência a múltiplos fármacos (MDR) estende-se a todos os aspectos da medicina e ameaça os progressos significativos que foram realizados nas áreas de transplante, oncologia, cirurgia e infectologia nos últimos anos.

Entre todos os fármacos, os antimicrobianos estão entre os mais comumente prescritos. A consequência inevitável do uso disseminado dos antimicrobianos foi o aparecimento de patógeno resistentes a estes fármacos, levando a uma necessidade cada vez maior de novos medicamentos. Porém, o ritmo de desenvolvimento dos antimicrobianos diminuiu drasticamente. Atualmente ocorre a introdução de um pequeno número de novos fármacos na prática clínica, e destes poucos apresentam novos mecanismos de ação, ficando suscetíveis aos atuais mecanismos de resistência (BRUNTON et al., 2006).

A dinâmica do surgimento e disseminação da resistência bacteriana aos antimicrobianos envolve diversos fatores que interagem e contribuem para a seleção de bactérias. No entanto, como determinante para evolução do microrganismo, talvez, o principal fator seja a elevada capacidade bacteriana em mobilizar genes de resistência. Elementos genéticos móveis possibilitam a mobilização de múltiplos genes permitindo a sobrevivência de microrganismos sob pressão seletiva de antimicrobianos de diferentes classes. Os plasmídeos são moléculas de DNA extracromossômicas que possuem capacidade de replicação independente e mobilização de genes de resistência de uma célula bacteriana para outra (transmissão horizontal), não se limitando à transferência intraespécies (FROST et al., 2005).

Como artifício de escape da atividade dos antimicrobianos, as bactérias possuem mecanismos de resistência diversos: (I) alteração na permeabilidade da membrana externa bacteriana (mediada pela perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa, conhecidas como porinas), (II) hiperexpressão de bomba de efluxo, (III) alteração do sitio alvo que dificulta ou impede a ligação do antimicrobiano e (IV) produção de enzimas que degradam ou inativam o antimicrobiano (TENOVER, 2006). O principal mecanismo de resistência em Gram-negativos aos β -lactâmicos é decorrente da produção de β -lactamases, que são

enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, impossibilitando, assim, a sua atividade antimicrobiana (TENOVER, 2006).

O impacto clínico das β -lactamases é relacionado mais à combinação de fatores funcionais do que estruturais. Atualmente existem aproximadamente 1302 β -lactamases descritas e várias contêm diferença em apenas um aminoácido, incluindo ainda, hidrólise específica, níveis diferentes de expressão enzimática, e a possibilidade de atuação juntamente com outro mecanismo de resistência (BUSH, 2013). Isto acaba por dificultar ainda mais a escolha da terapia adequada, pois o mesmo microrganismo pode apresentar vários mecanismos de resistência combinados, como por exemplo, a combinação de uma enzima cromossômica tipo AmpC e/ou produção de β -lactamases de amplo espectro (ESBL) associado a expressão reduzida de porinas ou a hiperexpressão de sistemas de efluxo, fazendo com que este seja resistente a quase todas as classes de antimicrobianos disponíveis (ANDERSON et al., 2007; GÜLMEZ et al., 2008; BRATU et al., 2005 [a]).

Nos últimos anos tem sido observada maior incidência de bacilos Gram-negativos resistentes a cefalosporinas de amplo espectro no ambiente hospitalar, acarretando, assim, maior uso de β -lactâmicos mais potentes, como os carbapenêmicos. A maior utilização destes fármacos neste ambiente acaba por ocasionar maior pressão seletiva sobre a microbiota nosocomial, fazendo com que ocorra a seleção de subpopulações de microrganismos com sensibilidade diminuída ou resistente a esses antimicrobianos (MENDES et al., 2006). Os carbapenêmicos, a partir do final da década de 1980, foram instituídos como alternativas terapêuticas de última escolha para o tratamento de infecções graves, principalmente aqueles causados por bactérias Gram-negativas multirresistentes produtoras de ESBL, como também pelas hiperprodutoras de β -lactamases AmpC especialmente de origem hospitalar (BRATU et al., 2005 [b]).

O crescente aumento mundial de isolados clínicos de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. produtoras de enzimas tipo CTX-M, β -lactamases de espectro estendido e AmpC tem dirigido a escolha terapêutica cada vez mais no sentido dos carbapenêmicos. Em varias localidades é cada vez mais frequente encontrar mecanismos de resistência a estes fármacos, justificando a atual preocupação com estes microrganismos (WOODFORD et al., 2008). Dentre as diferentes classes de β -lactamases, as carbapenemases pertencem à família mais versátil pela ampla atividade hidrolítica a maioria dos antimicrobianos β -lactâmicos além de apresentar

uma fraca inibição por inibidores de β -lactamases comerciais (QUEENAN & BUSH, 2007).

As carbapenemases são diversas, incluindo representantes de β -lactamase das classes moleculares A , B (metaloenzimas) e D (OXA enzimas). As metalo- β -lactamases (MBL) são β -lactamases pertencentes à classe B de Ambler ou classe 3 de Bush, apresentam capacidade de hidrolisar todos os β -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos. O mecanismo de hidrólise destas enzimas são dependentes do zinco (Zn^{+2}), como cofator para atividade enzimática. São conhecidas nove famílias de MBL adquiridas: IMP (imipenemase), VIM (*Verona imipenemase*), SPM (São Paulo metalo- β -lactamases), GIM (*German imipenemase*), SIM (Seoul imipenemase), AIM (Austrália Imipenemase), KHM (*Kyorin University Hospital Metallo- β -lactamase*), DIM (*Dutch Imipenemase*) e NDM-1 (*New Delhi Metallo- β -lactamase*). Sendo esta última a mais recente MBL relatada. A enzima NDM-1 foi detectada pela primeira vez em uma linhagem de *K. pneumoniae* isolado em 2008 em um paciente que retornava para Suécia vindo da Índia, onde a NDM-1 é frequentemente encontrada em membros da família *Enterobacteriaceae* (CORNAGLIA et al., 2011). Existe uma relação muito grande do chamado “turismo médico” na Índia com pacientes infectados/colonizados por bactérias produtoras da enzima NDM e sua disseminação nos países de origem (PITOUT et al., 2010).

A três grandes famílias de serino-carbapenemases da classe A incluem as enzimas IMI/NMC-A (*Imipenem-hydrolyzing β -lactamase/Not metalloenzyme carbapenemase-A*), SME (*Serratia marcenscens enzyme*) e KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) que se caracterizam por hidrolisar uma variedade de antimicrobianos β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas e aztreonam e podem ser inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam. O quarto tipo de enzima desta classe são as GES (*Guiana-extended spectrum*), originalmente denominadas de ESBL, porém com as novas variantes descobertas demonstraram uma leve hidrólise de imipenem (QUEENAN & BUSH, 2007).

Carbapenemases IMI/NMC-A e SME são enzimas codificadas por genes de localização cromossômica que apresentam um perfil de resistência para carbapenêmicos, mas estranhamente são sensíveis às cefalosporinas. Estes mecanismos são caracterizados esporadicamente em espécies de enterobactérias. Sua baixa prevalência está relacionada com a sua localização, sem apresentar nenhuma associação com elementos móveis (QUEENAN & BUSH, 2007). Dentro

desta categoria a família KPC tem o maior potencial para a disseminação devido a sua localização plasmidial, facilitando assim a transmissão de resistência aos carbapenêmicos entre as amostras (VILLEGAS et al., 2006).

A enzima KPC (KPC-1) foi identificada pela primeira vez em uma *K. pneumoniae* isolado na Carolina do Norte, nos Estados Unidos da América a descoberta desta KPC foi rapidamente seguida por vários relatos de uma única variação de aminoácidos, surgindo a KPC-2. Como a primeira detecção da enzima foi em *K. pneumoniae* e o potencial de hidrólise era de carbapenemase, a β -lactamase foi nomeada como KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). Embora alterações na expressão de porinas pudessem contribuir com o fenótipo encontrado, a produção de KPC foi determinante para a resistência aos carbapenêmicos (YIGIT et al., 2001).

Atualmente existem 10 variantes de KPC descritas, sendo a KPC 2 e KPC 3 as mais predominantes, estas enzimas são reportadas principalmente em amostras de *K. pneumoniae*, embora exista relatos crescentes em outros gêneros da família *Enterobacteriaceae*. Microrganismos não fermentadores como *Pseudomonas* e *Acinetobacter* também têm sido reportados como produtores de KPC (NORDMANN, CUZON, NAAS, 2009)

A capacidade de detecção destas enzimas depende da qualidade do microbiologista, como observação cuidadosa, experiência e capacidade de decisão clínica, pois, bactérias produtoras de KPC podem não expressar resistência aos carbapenêmicos *in vitro*, pelos testes convencionais e, se o carbapenêmico for a opção terapêutica e seleção de bactérias produtoras dessa enzima (CLSI, 2009)

O *Clinical Laboratory Standart Institute* (CLSI) em 2009 determinou um *screening* para a determinação dos níveis de susceptibilidade aos carbapenêmicos em enterobactérias suspeitas de produzirem carbapenemase. Também foi proposta a realização do Teste de Hodge modificado para a detecção destas enzimas, principalmente para propósitos epidemiológicos de controle de infecção. No entanto, os testes fenotípicos que combinam a alta sensibilidade e alta especificidade na detecção destas enzimas estão em estudo. Testes com tais características são particularmente necessária em regiões onde a produção de MBL ou outros fatores de resistência são freqüentemente detectados entre os isolados de *K. pneumoniae* com sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos. O teste de disco combinado com ácido borônico é um teste fenotípico que pode ser utilizado para determinar a

produção de KPC em isolados clínicos de *K. pneumoniae*, teste este, que se mostrou com elevada sensibilidade e especificidade para detecção destas enzimas, pois este ácido apresenta uma atividade inibitória contra as KPC (TSAKRIS et al., 2009).

Bactérias produtoras de KPC são resistentes a todos os β -lactâmicos, em adição, produtores destas enzimas são frequentemente resistentes a muitos antimicrobianos não β -lactâmicos. Assim sendo, o tratamento de infecções por essas bactérias é cada vez mais restrito, pois as opções terapêuticas são limitadas pelas propriedades farmacológicas, efeitos colaterais, problemas de administração e limitações de eficácia. Também foi observado que a monoterapia para combater essas infecções geralmente não possui boa resposta clínica, sendo necessária a associação de antimicrobianos e ajustes nos protocolos. Ainda dentro deste contexto a nefrotoxicidade é o maior evento adverso associado com o uso de aminoglicosídeos e polimixinas (DUIN et al., 2013).

Em geral, bactérias possuem grande plasticidade genética que permite a aquisição e transmissão de genes de resistência e sua seleção em ambientes hostis nos quais existe pressão de antimicrobianos, apresentando-se também como microrganismos problema em infecções crônicas com tratamento prolongado ou de difícil penetração do antimicrobiano, tendo em vista que muitos microrganismos apresentam capacidade formadora de biofilme (HOIBY et al., 2010).

1.3 Biofilmes

Microrganismos aderentes em dispositivos médicos e tecidos vêm se tornando uma significativa causa de infecções persistentes. Estes microrganismos se organizam em uma matriz hidratada de polissacarídeos e proteínas. O exame microscópico de superfícies colonizadas com esta matriz mostra densos agregados microbianos mantidos por uma grande quantidade de polímeros extracelulares difusos. Esta complexa estrutura se chama biofilme. Mais de 75 anos após o primeiro relato de um biofilme (ZOBELL, 1937), esta estrutura continua até hoje, sendo uma grande preocupação nas diferentes áreas do conhecimento.

Os microrganismos associados em biofilmes exibem um comportamento completamente diferente dos microrganismos que permanecem na forma planctônica, especialmente no crescimento celular e na resistência aos agentes

antimicrobianos. Mesmo em indivíduos imunocompetentes as infecções em que há o envolvimento de biofilmes são raramente resolvidas. Na verdade, os tecidos adjacentes ao biofilme formado podem sofrer consequências, especialmente em função da presença de neutrófilos e imunocomplexos formados, levando a cronificação do processo infeccioso-inflamatório (STEWART & COSTERTON, 2001).

Testes de suscetibilidade em modelos de formação de biofilme *in vitro* demonstraram que o biofilme microbiano sobrevive mesmo em concentrações de centenas ou até milhares de vezes a concentração inibitória mínima (CIM) dos microrganismos em suspensão. Estudos *in vivo* mostram que os antimicrobianos podem suprimir os sintomas do processo infeccioso por matar ou inibir o crescimento dos microrganismos planctônicos, mas não conseguem eliminar os microrganismos incorporados ao biofilme. Com o final da terapêutica antimicrobiana, o biofilme serve como uma fonte para a recorrência da infecção. Este processo infeccioso tende a persistir até a remoção (na grande maioria das vezes cirúrgica) da superfície colonizada (DUNNE, 2003).

A maioria das infecções causadas por biofilmes estão associadas à utilização de implantes médicos invasivos (cateteres intravenosos e urinários, próteses ortopédicas, mamárias, etc.). Atualmente um grande número de cateteres são inseridos em pacientes todos os anos, e destes mais de 60% acabam relacionados com a formação de biofilmes. Nestes casos, o período de hospitalização pode aumentar de 2 a 3 dias onerando em 1 bilhão de dólares, todos os anos, os custos associados ao manejo destes pacientes (DAVEY & O'TOOLE, 2000). O desenvolvimento e maturação do biofilme dependem do tipo e do número de microrganismos que aderem ao dispositivo, do tipo de superfície que constitui o dispositivo e das características do meio/fluido em que os microrganismos estão expostos (DONLAN, 2001).

A natureza da matriz estrutural e as características celulares dos microrganismos que constituem o biofilme conferem resistência aos agentes antimicrobianos. Os mecanismos responsáveis pela resistência aos antimicrobianos podem estar relacionados com limitações difusionais à passagem do agente pela matriz extracelular, com alterações fenotípicas das células no biofilme e ainda com o desenvolvimento de diversos mecanismos de resistência por alterações genéticas dos microrganismos (STEWART & COSTERTON, 2001).

O processo de formação do biofilme inicia-se com a adesão microbiana e a

posterior maturação do biofilme. A fase de adesão inicial é caracterizada pela aproximação do microrganismo à superfície de adesão. Uma vez atingida a distância crítica (<1nm) a interação entre o microrganismo e a superfície depende do somatório das forças atrativas e repulsivas geradas entre estas duas superfícies (forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de Van Der Waals). As forças eletrostáticas tendem a repelir as duas superfícies, já que a maioria dos microrganismos e superfícies inertes estão carregadas negativamente e as interações de Van Der Waals têm influência positiva na adesão microbiana. Este estágio inicial de adesão em que há envolvimento destas interações físico-químicas entre as superfícies denomina adesão primária (CARPENTIER & CEREF, 2003).

Em uma fase mais avançada deste processo de adesão celular, são estabelecidos vários fenômenos que irão caracterizar a chamada adesão secundária (AN et al., 2000). Neste estágio, os microrganismos que estão fracamente aderidos consolidam o processo de adesão, produzindo exopolissacarídeos (EPS). Os EPS formados se complexam com os materiais da superfície onde ocorre a adesão e/ou através de receptores específicos localizados na superfície das paredes celulares ou nas extensões celulares (como pili ou fímbrias). Após a adesão à superfície, inicia o processo de maturação do biofilme. Um biofilme maduro pode conter um grande número de microcolônias (formadas por diferentes espécies de microrganismos), que são interceptadas por canais de água (que permitem a passagem dos nutrientes) (HAWSER & DOUGLAS, 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Detectar mecanismos de resistência, propriedades adesivas e capacidade de formação de biofilmes de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes.

2.2 Objetivos Específicos

- Detectar *K. pneumoniae* produtoras carbapenemases (KPC) através de testes fenotípicos;
- Detectar o gene *bla_{KPC}* através de testes moleculares;
- Investigar a capacidade de produtora de biofilme nas amostras em estudo;
- Avaliar características de hidrofobicidade e ácido/bases de Lewis da superfície celular bacteriana;
- Determinar a capacidade de adesão celular das amostras em estudo.

3 MANUSCRITOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de dois manuscritos. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se compondo os próprios manuscritos e representam a íntegra deste estudo.

O manuscrito I foi submetido à revista *Brazilian Journal of Microbiology*.

O manuscrito II foi submetido à revista *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*.

3.1 Manuscrito I

Failure on Phenotypic Identification of KPC

Carlos Hugo Del Priore Winckler Neto¹; Roberto Christ Vianna Santos^{2*}; Márcia Ebling de Souza²; Daniele Coradini Zamberlan³; Rodrigo de Almeida Vaucher⁴; Bruno Stefanello Vizzotto⁴; Marli Matiko Anraku de Campos¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria;

² Programa de Pós-Graduação em Nanociências, Centro Universitário Franciscano;

³ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria;

⁴ Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, Centro Universitário Franciscano.

***Corresponding Author:** Prof. Roberto Christ Vianna Santos, Ph.D

Laboratório de Pesquisa em Microbiologia

Sala 413-A - Prédio 4 – Conjunto 1, Centro Universitário Franciscano – UNIFRA, Rua dos Andradas 1614, Zip Code 97010-032, Santa Maria-RS, Brazil.

E-mail: robertochrist@gmail.com

ABSTRACT

The early detection of KPC became compulsory due to reduced therapeutic options and easy dissemination. In this study, 30.3% of the isolates presented positivity for modified Hodge test and 6,1% for boronic acid, indicating the presence of KPC. The *bla*KPC gene was not detected when molecular characteristics were analyzed.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, Bacterial Resistance, Carbapenemases

The carbapenems have been considered relevant agents for Gram negative infections, representing the main antimicrobial agent chosen to treat extended spectrum β -lactamases (ESBLs) producing enterobacteria, especially when caused by nosocomial pathogens (3). However, a number of resistance mechanisms can reduce the effectiveness of carbapenems. The production carbapenemases is predominantly among these mechanisms (9).

The carbapenemases are diverse and include representatives of β -lactamase from molecular classes A, B (metalloenzymes) and D (OXA enzymes) (16). A small but highly powerful molecular group of class A carbapenemases includes KPC, NMC-A, SME, IMI, and GES and has been sporadically classified as species of enterobacteria. Within this category, KPCs are the most frequently isolated and present the largest dissemination potential due to their plasmid location (13). The main host for KPC enzyme is *Klebsiella pneumoniae*, an organism notorious for its determining capacity of accumulation and transference of resistance (8, 11, 14, 15).

KPC (KPC-1) was first identified in an isolated *K. pneumoniae* in North Carolina, USA (16). After the rapid expansion of KPC along the east coast of the United States, a number of researchers from several countries began reporting the

production of these enzymes (10). The KPC confers resistance to all β -lactam agents including penicillins, cephalosporins, monobactams, and carbapenems (1), providing limited therapeutic options, especially polymyxins (3).

Different phenotypic techniques are applied to track KPC, such as, disk diffusion, e-test (2), modified Hodge test (MHT) (1), and boronic acid disk test (BA) (12). It is still possible to investigate the *bla*KPC gene by polymerase chain reaction (PCR) or ribotyping, the last being the gold standard for detection of these enzymes.

Provided that there have been reports of association among different mechanisms of resistance, this study aims to investigate the association of phenotypic tests such as MHT and BA with *bla*KPC gene detection by PCR.

In this study, we analyzed 33 clinic isolates *K. pneumonia* strains from various sites of infection such as blood (9; 27.3%), urine (9; 27.3%), sputum (5; 15.1%), tracheal aspirate (3; 9.1%), bronchoalveolar lavage (2; 6.1%) and others (thorax drain, stump secretion, catheter tips, peritoneal fluid, urethral secretion) (5; 15.1%) from patients admitted to a private midsize hospital in Porto Alegre, RS - Brazil. All isolates presented zones of inhibition smaller than 21mm for ertapenem (ERT) and/or zones smaller than 22mm for meropenem (MER) to detect carbapenemases, as proposed by Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (4). The identification of the bacterial species was carried out by automation employing the equipment Mini API (Bio Merieux), using ID-32 strips. The present study was approved by UNIFRA Ethics Committee on Human Research under the number 381.2008.2.

For the phenotypic detection of ESBL and carbapenemase, the samples were submitted to the combined-disk test incorporating clavulanic acid and the modified Hodge test, respectively, according to CLSI (4). The samples were also submitted to

phenotypic detection of KPC, employing the technique of boronic acid disk test, according to Tsakris et al. (13). For the detection of *bla*KPC gene, a PCR-based molecular technique was employed. The plasmid DNA extraction of the strains was carried out by using the Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit (Invitek). The primers used in this study were KPC-F (5'-TCGCTAAACTCGAACAGG-3') and KPC-R (5'-TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC -3'), which amplify an internal fragment with 795 base pairs of the *bla*KPC gene. These primers were previously described by Lomaestro et al. (7). For a final volume of 25 μ L, 2,5 μ L of DNA was added to 22,5 μ L of the reagents mixture of the PCR containing Plug Taq DNA polimerase 1X, 2mM of MgCl₂, 250 μ M of deoxynucleotide, 1,5U of Taq DNA polimerase and 0,4 μ M of each primer. The amplification conditions consisted of an initial cycle at 95°C for 5 minutes, followed by 35 1-minute cycles at 95°C, 30 seconds at 62°C and 1 minute and 30 seconds at 72°C, followed by a final cycle at 72°C for 10 minutes. The amplified was developed in 1% agarose gel stained with 5 μ g/ml ethidium bromide, analyzed in UV transilluminator and photographed.

The quality control employed in this study was a standard strain of *K. pneumoniae* producing KPC-2, which served as base for the visualization of the positive MHT reaction and for the technique combined-disk with boronic acid, as well as for the standardization of the reaction parameters and the evaluation of the PCR effectiveness with regard to the quantity of *bla*KPC gene copies, which would be detected by this technique. As negative control, the *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 strain was used. For the quality control of the technique combined-disk with clavulanic acid for the production of the enzyme ESBL, the *K. pneumoniae* ATCC 700603 standard strain was used, and, as negative control, the *E. coli* ATCC 25922 strain.

The findings show that out of 33 clinical isolates analyzed by using MHT, 10 strains (30.3%) presented a distortion in the zone of inhibition of the ertapenem, resulting in positivity for the detection test of carbapenemase. MHT is a phenotypic test which can be employed to determine the reduced sensitivity to carbapenems, mediated by the production of a carbapenemase. It has also been used to evaluate the detection of mediated resistance by KPC (1). Nevertheless, MHT is considered a very subjective test, i.e., exhibits high sensitivity, but low specificity, since the same microorganism could present several resistance mechanisms combined, for instance, the combination of a chromosomal enzyme type AmpC and the release of porins or the production of extended spectrum β -lactamases (ESBL) plus the release of porins, what could cause confusion among the laboratory practitioners (1, 5, 3, 8).

The phenotypic detection of *K. pneumoniae* isolates producing carbapenemases is essential to limit the spread of this resistance mechanism. In the clinic laboratory, the detection of metallo- β -lactamase production (MBL) in *K. pneumoniae* isolates can be determined with reliability employing double-disk synergy tests and combined-disk test with imipenem and EDTA, which accurately identifies MBLs even among populations of microorganisms sensitive to carbapenems. However, the detection of KPC in *K. pneumoniae* remains an issue so complex that laboratory strategies for the identification of this resistance need to be revised and adapted (12). These enzymes present variations, such as where the presence of this gene does not necessarily represent phenotypic resistance to carbapenems, complicating the detection of these enzymes (8).

CLSI 2009 (4) determined a screening for the establishment of the levels and the execution of MHT as a reference technique capable of detecting carbapenemases. Nevertheless, the phenotypic tests, which combine high sensitivity

with high specificity for the detection of these enzymes, have been studied. Tests with these characteristics are particularly required in regions where the production of MBLs or other resistance factors are frequently detected among isolates of *K. pneumoniae* with reduced susceptibility to carbapenems.

Taking into consideration the low specificity of MHT, a combined-disk test incorporating boronic acid was carried out to detect the phenotypic KPC. This test was described by Tsakris et al.(13) as a significant option to detect *Klebsiella pneumoniae* producing KPC. The addition of this acid presented an inhibitory activity against KPCs. Among the 33 strains analyzed, 2 (6.1%) presented positivity for BA test, classified as producing KPC.

Phenotypic tests can be carried out to track KPC. However, false-positives or samples with dubious results can occur. Thus, it is important to use a methodology of detection by molecular biology, such as the polymerase chain reaction (PCR) technique. This has been described as an excellent tool to detect resistance genes, since they present high sensitivity and specificity. The strains (30.3%) presenting positivity for MHT were subjected to PCR for the detection of *bla*_{KPC} gene. This gene was not detected in any clinical isolate, even in the two positive strains for BA test.

This failure on the phenotypic detection can be explained by several factors: the sensitivity and specificity of the molecular techniques, as, for instance, PCR rates are higher than phenotypic technique rates, such as MHT and BA; simultaneous actions of resistance mechanisms can be occurring, for instance, the hyper-production of AmpC and/or ESBL (mainly CTX-M-2, but also CTX-M-15, CTX-M-59) and the reduced expression of porins; the isolates could be housing other class A carbapenemases, such as NMC-A, Sme, IMI, and GES (9). It is worth mentioning that among the 33 isolates analyzed, 31 (93.9%) were positive for ESBL when using

the phenotypic test, strengthening the possibility of involvement of other resistance mechanisms concomitantly with the presence of MHT positive.

The early recognition of strains producing carbapenemases becomes of vital importance, considering the large number of treatment failure reports associated with these enzymes. A uniform and standardized phenotypic tool to detect KPC (with high sensitivity and specificity) associated with brevity, ease of execution and low costs is still required.

In this study, it was found that among the 33 clinic isolates which presented reduced susceptibility to carbapenems, 10 (30.3%), 2 (6.1%) presented positivity to MHT and BA respectively, suggesting the presence of KPC. However, analyzing these strains by using molecular methods to search *bla*KPC gene, the presence of this genomic material was not detected.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. Rodrigo Mendes, from Special Laboratory of Clinical Microbiology (LEMC) - Unifesp, who kindly conceded us the control strain KPC-2.

REFERENCES

1. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, Mcdougal LK, Carey RB, Thompson A, Stocker S, Limbago B, Patel JB (2007) Evaluation of Methods to Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* 45:2723-2725.
2. Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, Rahal JJ, Brooks S, Cebular S, Quale J (2004) Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem- Hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -Lactamases in New York City. *Clinical Infectious Diseases* 39:55–60.
3. Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, Landman D (2005) Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular

- epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56:128–132.
4. CLSI (2012) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 22th informational supplement. M100–S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 5. Gülmez D, Woodford N, Alepou MF, Mushtaq S, Metan G, Yakupogullari Y, Kocagoz S, Uzun O, Hascelik G, Livermore DM (2008) Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *International Journal of Antimicrobial Agents* 31:523-526.
 6. Livermore DM (1995) β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 8:557-584.
 7. Lomaestro BM, Tobin EH, Shang W, Gootz T (2006) The Spread of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase – Producing *K. pneumoniae* to Upstate New York. *Clinical Infectious Disease* 43:26-28.
 8. Moland ES, Hanson ND, Herrera VL, Black JA, Lockhart TJ, Hossain A, Johnson JA, Goering RV, Thomson KS (2003) Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51:711–714.
 9. Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A (2010) Controlling false-positive results obtained with the hodge and masuda assays for detection of class a carbapenemase in species of *Enterobacteriaceae* by incorporating boronic acid. *Journal of Clinical Microbiology* 48:1323–1332.
 10. Nordmann P, Poirel L (2002) Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 8:321–331.
 11. Queenan AM, Bush K (2007) Carbapenemases: the versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 20:440–458.
 12. Rasheed JK, Biddle JW, Anderson KF, Washer L, Chenoweth C, Perrin J, Newton DW, Patel JB (2008) Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid. *Journal of Clinical Microbiology* 46:2066-2069.
 13. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Themeli-digalaki K, Ikonomidis A, Petropoulou D, Pournaras S, Sofianou D (2009) Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 47:362-367.
 14. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, Quinn JP, et al (2006) First detection of the plasmid-mediated class a carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from south America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50:2880–2882.

15. Wei ZQ, Du XX, Yu YS, Shen P, Chen YG, Li LJ (2007) Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumonia* isolate from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51:763-765.
16. Woodford N, Zhang J, Warner M, Kaufmann ME, Matos J, Macdonald A, Brudney D, Sompolinsky D, Venezia-Von S, Livermore DM (2008) Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62:1261-1264.

3.2 Manuscrito II

Cellular adhesion, hydrophobicity and biofilm formation associated with multiresistant *Klebsiella pneumoniae*

Carlos Hugo Del Priore Winckler Neto^a; Roberto Christ Vianna Santos^{b,c*}; Camilla Filippi dos Santos Alves^c; Leonardo Quintana Soares Lopes^{b,c}; Pabline Tolfo^c; Amanda Franken^c; Viviane Fausto^c; Márcia Eblin de Souza^{b,c}; Marli Matiko Anraku de Campos^a

^a Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria.

^b Post-graduate Program in Nanoscience, Franciscan University Center.

^c Laboratory for Research in Microbiology, Franciscan University Center.

***Corresponding Author:** Prof. Roberto Christ Vianna Santos, Ph.D

Laboratory for Research in Microbiology

Sala 413-A - Prédio 4 – Conjunto 1, Centro Universitário Franciscano – UNIFRA,
Rua dos Andradas 1614, 97010-032, Santa Maria-RS, Brasil.

E-mail: robertochrist@gmail.com

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is a significant pathogen which is frequently involved in infections related to biofilm production. Among *Enterobacteriaceae* species, it is one of the most well-known producers of extended spectrum β -lactamases and it is an organism notorious for its determining ability of accumulation and transference of resistance mechanisms. In this study, 14 *K. pneumoniae* multidrug-resistant (MDR) strains were isolated from various sites of infection of nosocomial patients and investigated for biofilm production by using the methods Congo red agar (CRA) and polystyrene plate assay. The isolates hydrophobicity was evaluated by microbial adhesion to hydrocarbons (MATH) and the cellular adhesion was determined by the adherence in buccal epithelial cells (BEC), examined by optical microscopy. The present results show the affinity with xylene was low, suggesting hydrophilic character for most of the strains studied. The strong affinity for basic solvent (ethyl acetate) indicates the majority of *K. pneumoniae* in this study presents acidic character. This study also indicated the high capacity of different MDR *K. pneumoniae* clinic isolates to form biofilm and adhere to epithelial cells. The combination of all these capacities may contribute to the survival of these organisms and their spread in the nosocomial environment.

Key words: Extended Spectrum β -lactamase, Enterobacteriaceae, Cell Surface

1 INTRODUCTION

Klebsiella spp. is a pathogen widely known as a significant cause for community-acquired pneumonia, and nosocomial infections. The incidence of infections caused by *Klebsiella spp.* is 5 to 7% of all nosocomial infections, and it has been classified among the 8 most considerable infectious agents in these

environments. The most clinically relevant species within the genus is *Klebsiella pneumoniae* [1.2]. In a quite frequently way, this opportunistic pathogen infects patients who use indwelling medical devices. The biofilm formation on these devices is extremely relevant in the pathogenesis of various infections, such as cystic fibrosis, infections associated with the use of lung ventilators, catheters, urinary probes and others [3].

The infections associated with biofilm formation on catheters cause the death of approximately 10,000 patients and hospital expenses of about \$11 billion per year in the United States [4]. It is estimated that the biofilm formation occurs in 20% of urinary catheters inserted into patients and, therefore, therapeutic difficulties will occur too. Furthermore, approximately 70,000 people are diagnosed with cystic fibrosis and this condition is closely related with biofilm-forming microorganisms. In all these cases, it is common the involvement of different strains of *K. pneumoniae*, which, beyond the ability of organization in biofilms, present high levels of resistance [5.6]

The mutation frequency of biofilm-growing bacteria is significantly increased compared with planktonically growing isogenic bacteria [7] and there is increased horizontal gene transmission in biofilms [8]. These physiological conditions may explain why biofilm-growing bacteria easily become multidrug resistant by means of traditional resistance mechanisms against β -lactam antibiotics, aminoglycosides and fluoroquinolones, which are detected by routine susceptibility testing in the clinical microbiology laboratory where planktonic bacterial growth is investigated.

The surface hydrophobicity of bacteria is one of the non-specific factors contributing to their adherence. The hydrophobic properties of bacteria are responsible for biofilm formation and adhesion to epithelial cells. Bacterial adherence

to the epithelial surface is considered as one of the important factors in the infection process. Adherence is an interaction between adhesin molecules on the bacterial cell surface and complementary receptor molecules on the host cell surface. Microorganisms adhere to epithelial cells in a highly selective manner and thus cannot be removed by the unspecific defense mechanisms of the urinary, respiratory, gastrointestinal and genital tracts [9.10].

The aim of this study was to determine the hydrophobicity, autoaggregation, adhesion to epithelial cells and the ability of multiresistant *K. pneumoniae* strains to form biofilms.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Identification of *K. pneumoniae* strains

In this study, 14 *K. pneumoniae* strains of clinical isolates from various infectious sites of nosocomial patients were analyzed, as shown in Table 1. The multidrug-resistant characteristic was conferred on isolates positive for the phenotypic test to detect extended spectrum β -lactamases (ESBL) and that presented zones of inhibition smaller than 21mm for ertapenem (ERT) and/or zones smaller than 22mm for meropenem (MER) to detect carbapenemases, as according to CLSI [11]. The identification of the bacterial species was carried out by automation employing the equipment Mini API (Bio Merieux), using ID-32 strips.

2.2 Phenotypic characterization of *K. pneumoniae*-producing slime

Biofilm formation was studied by culturing the isolated strains on Congo red agar plate (CRA) made by mixing 36g saccharose (Vetec, Brasil) with 0.8g Congo red (Vetec, Brasil) in 1L of brain heart infusion agar (Oxoid) and incubated at 37⁰C for 24h under aerobic conditions [12]. Results were interpreted as follows: very black, black and almost black or reddish-black colonies on CRA were considered to be

slime-producing strains, while very red, red, bordeaux as considered non-slime-producing strains, as described previously [13].

2.3 Microtiter plate biofilm assay

Biofilm study was performed by the method published by Merritt et al. [14] with modifications. Briefly, *K. pneumoniae* strains were inoculated in 2-5 mL of Trypticase soy broth (TSB) and grew up to stationary phase respectively and the turbidity was adjusted at 0.5 MacFarland scale. 100 μ L of each dilution was pipetted to 96 wells in a sterile flat bottom microtiter plate. After incubation at 37C^o for 24h, planktonic bacteria were removed from all of the wells and washed with saline solution (NaCl 0.9%) for three times. 100 μ L of 0.5 % crystal violet solution (Sigma Chemical Co) were added to each well, and then washed with distilled water twice. Microplates were inverted and vigorously tapped on paper towels to remove any excess liquid and air dried. 200 μ L of 95% ethanol were poured in wells. Biofilm stains were solubilized at room temperature. After shaking and pipetting of wells, 200 μ L of the solution from each well were transferred to a new microtiter plate and biofilm formation was assayed by measuring the absorbance of the crystal violet solution at 570nm (optical density – OD₅₇₀). Negative control (only culture media) and positive control *Pseudomonas aeruginosa* PA01 were used as controls.

For the interpretation of biofilm results, the isolates were classified as follows: non-producing, weak, moderate and strong-producing, based on the following optic density (OD) average values: OD (isolate) \leq OD (negative control) = non-biofilm-producing; OD (negative control) \leq OD (isolate) \leq 2 x OD (negative control) = weak producing; 2 x OD (negative control) \leq OD (isolate) \leq 4 x OD (negative control) = moderate-producing; 4 x OD (negative control) \leq OD (isolate) = strong-producing [15].

2.4 Autoaggregation assay

The autoaggregation ability was measured as described by Del Re et al. [16]. Briefly, bacterial suspensions in PBS ($OD_{600} = 0.6 \pm 0.02$) were shaken and incubated at 37°C for 2 hours. At 1.5; 3; 6; 12 and 24 hours after shaking, 1 mL of the surface of each suspension was carefully removed and transferred to another tube, and the OD_{600} was measured by a spectrophotometer. The autoaggregation percentage was expressed as $1 - (OD_{600} \text{ for upper suspension} / OD_{600} \text{ for total bacterial suspension}) \times 100$.

Autoaggregating cells formed large clusters that precipitated ($\geq 70\%$ autoaggregation) non autoaggregating cells that produced constant turbidity for long periods due to a lack of clusters ($\leq 20\%$ autoaggregation) [17].

2.5 Bacterial hydrophobicity assays

Microbial adhesions to hydrocarbons (MATH) were measured by the method of Zárate et al. [17] with some modifications. Briefly, bacterial suspensions were prepared as described for autoaggregation analysis and re-suspended in 0.1 M KNO_3 (low ionic strength) (pH 6.2). Two milliliters of bacterial suspension ($A_0 = 0.6 \pm 0.02$) was put in contact with 0.5 mL of each of the following test solvents: p-xylene, chloroform, and ethyl acetate after 10 min of pre-incubation at room temperature, the 2-phase system was mixed on a vortex for 2 min. After allowing the hydrocarbon phase to rise completely (for 4 hours at room temperature), the aqueous phase was removed and the absorbance at 600nm was determined again (A_1). The percentage of microbial adhesion to the solvent was calculated as $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$. To define hydrophobicity characteristics, the strains were divided into 3 categories according to Hydrophobicity index (HI): strains with highly hydrophilic ($HI < 30\%$), average hydrophobic ($30\% < HI < 70\%$) and highly hydrophobic ($HI > 70\%$).

Hydrophobicity was calculated from 3 replicates as the percentage decreases in the optical density of the original bacterial suspension due to cells partitioning into a hydrocarbon layer.

2.5.1 Chloroform and ethyl acetate partition

By the use of the same methodology as MATH, but with chloroform and ethyl acetate, the basic and acidic characteristics of the cell surface were determined [18]. Chloroform is a Lewis acid, electron acceptor, with avidity for these substances able to give electrons (Lewis bases). Similarly, ethyl acetate, with basic characteristics, is avid for acidic substances. The results of this test are expressed as the percentage of strains with avidity for acidic and basic solvents, calculated with the same formula as used before.

2.6 Cellular adhesion

Human epithelial cells were collected from the mouth of four healthy volunteers, non-smoking, no alcohol drinking, not treated with antibiotics, and twice washed with PBS. The pellets were then re-suspended in PBS to give 10^5 cells per ml (counted in a Neubauer chamber). For the assay, 250 μ L of *K. pneumoniae* suspensions (0.5 Mc Farland scale) were mixed in tubes and incubated at 37°C for 2 hours. Negative control tubes contained epithelial cells and PBS without bacteria. The epithelial cells were collected on polycarbonate 8 μ m pore size filters (Millipore) and washed with 70 mL of PBS to remove unattached bacteria. The washed epithelial cells on the filters were air dried, fixed with absolute methanol and Gram-stained. The number of bacterial adhering per 100 epithelial cells was counted [19].

2.7 Statistical analysis

The totality of experiments were performed in 3 replicates and the data were expressed as mean value \pm standard deviation (SD); For biofilm formation, the

statistical method Student T test was employed. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

The present study was approved by UNIFRA Ethics Committee on Human Research under the number 381.2008.2.

3 RESULTS

3.1 Phenotypic characterization of *K. pneumoniae*-producing slime

All the 14 *K. pneumoniae* isolates analyzed were classified as slime producers, since all of them developed reddish-black, almost black and black colonies on the CRA plate, as shown in Table 1.

3.2 Biofilm assay

The findings show that among the 14 strains analyzed, 11 presented moderate characteristics for biofilm production and 3 are strong producers. The OD₅₇₀ values obtained to classify the isolates as non-producers, weak producers, moderate producers and strong producers of biofilm were respectively $OD_{570} \leq 0.067$; $0.067 \leq OD_{570} \leq 0.134$; $0.134 \leq OD_{570} \leq 0.268$; $0.268 \leq OD_{570}$, considering the standard deviation of negative control the amount of 0.0015, as shown in Figure 1.

3.3 Microbial adhesion to solvent

The results for adhesion of *K. pneumoniae* strains to solvent are summarized in Table 1 and 2. The affinity for p-xylene (non-polar solvent) was low, suggesting hydrophilic character for most of the strains investigated. On the other hand, 2 *K. pneumoniae* strains (Kp1 e Kp10) presented relatively hydrophobic character.

3.4 Autoaggregation

Since after 3 hours a relatively constant turbidity (Figure 2) was noticed, no highly autoaggregative phenotype was observed. Highly aggregative phenotypes are characterized by the rapid decrease in OD according to the formation of higher

density aggregates and consequent deposition at the bottom of the tube, which was not observed in this study.

3.5 Quantification of *K. pneumoniae* adherence to epithelial cells

In this study, the quantification of number of bacteria attached per 100 cells stained by Gram was analyzed by using optical microscopy. It was found that nearly all strains examined presented capacity of adhesion to epithelial cells, as shown in Figure 3.

4 DISCUSSION

The penetration of antimicrobial agents on the biofilm is retarded (taking into consideration the production of exopolysaccharide) whereas the transference of genetic material (conjugated plasmids) is significantly faster in biofilms, when comparing with planktonic conditions. These phenomena, therefore, make it possible to suggest microorganisms organized in biofilms present a greater propensity for acquisition and expression of resistance genes [20].

In the present study, 14 strains of *K. pneumoniae* producing ESBL were analyzed, the enzymatic production of ESBL impedes the therapeutic use of penicillins, cephalosporins and monobactams. Besides, these strains featured reduced susceptibility to carbapenems, suggesting the production of carbapenemases and/or coexistent mechanisms of resistance, such as hyperproduction of AmpC, ESBL, associated with reduced expression of porins [21]. Studies have demonstrated that *K. pneumoniae* presents high capacity for biofilm formation. Sanchez et al. [6], when comparing the resistance to antimicrobials with the capacity for biofilm formation, observed that the strains able to form biofilm were also more frequently characterized as multidrug-resistant phenotypes (MDR).

The probable reason for the 14 strains examined in this work to be biofilm producers and to be producing ESBL simultaneously may be associated with: 1) the biofilm is almost invariably a microbial community of one or more species, and these species are able to share their genetic material at high frequency and rates [22]; 2) ESBL can be induced by low concentration of antimicrobial agents, what frequently occurs in formed biofilms, due to the great amount of extracellular material which assures low penetration of drugs on the biofilm [23].

In a study carried out by Yang et al. [24], it was observed that strains of *K. pneumoniae* from patient sputum and urine present significant association with biofilm formation and ESBL production. Accordingly, the use of indwelling medical devices must be considered in choosing the appropriate antimicrobial therapy.

The assay to visualize the microbial growth on CRA plates has been widely employed as a screening method for biofilm formation [25]. Here, all 14 strains of *K. pneumoniae* studied were positive for this test, as shown in Table 1. Corroborating the results of the present study, Kouidhi [26] verified a high correlation between the results for CRA and the biofilm-forming ability, where the slime-producer phenotype is associated with the biofilm formation phenotype on polystyrene plates.

The ability of bacterial adhesion to host cells is considered as one of the first stages for colonization and subsequent infection [27.28]. The bacterial adhesion assay was performed to evaluate the binding efficiency of *K. pneumoniae* strains in epithelial cells. The present study indicated high rates of adherence to epithelial cells, as shown in Figure 3. Sandobol [29] verified that type 3 pili are regularly detected on the surface of *K. pneumoniae* strains. Such structures mediate the attachment of bacteria to host cells and are encoded by plasmid genes. Furthermore, these plasmids can be easily transferred by conjugation. This fact would explain the high

rates of adherence to epithelial cells of strains capable of biofilm formation in this study.

Bacterial adhesion can be divided into primary and secondary stages. The primary stage is reversible and determined by physico-chemical variables, such as van der Waals forces, Lewis acids and bases interactions, temperature and hydrodynamic forces. These variables will determine the adhesion between two surfaces: the bacterial cell and the surface of interest. On the secondary adhesion, a molecular mediation occurs between specific adhesins and surface, in which the microorganism consolidate its adhesion by producing a complex of exopolysaccharide and/or connecting specific receptors present in the pili with the material surface. At the end of this stage, the adhesion is irreversible [30.31]. For studies on microbial adherence, however, it is essential to know the physico-chemical properties of the organism, including hydrophobicity and Lewis acidic/basic characteristics.

At the present study, the surface acidic or basic characteristics of *K. pneumoniae* strains were studied by measuring cells partition between the aqueous phase and chloroform or ethyl acetate. Most of the strains (8, 57.1%) presented higher affinity for ethyl acetate, a basic solvent and donor of electrons, whereas 4 strains (28.5%) demonstrated affinity for chloroform (an acidic solvent and receptor of electrons), as shown in Table 1. The strong affinity for the basic solvent indicates acidic character for *K. pneumoniae*. Furthermore, these strains manifested affinity simultaneously for three hydrocarbons. The affinity for one solvent does not exclude the simultaneous affinity for other, suggesting bacterial cell surface great complexity. Nearly all strains expressed highly hydrophilic character, considering the low affinity for xylene. Many of the studies on microbial cell chemical surface revealed that the

presence of proteinaceous material at the cell surface results in higher hydrophobicity, while hydrophilic surfaces are associated with the presence of polysaccharides. [32.33]

Several studies have been demonstrating a positive association between the autoaggregative profile and the formation of biofilms [34]. Indeed, when a microorganism manifests highly autoaggregative character, it presents easiness to form biofilms. In this study, among the 14 isolates, none of them presented a phenotype of high autoaggregation, since all of them obtained autoaggregation rates lower than 70%. However, the strains examined presented significant ability to form biofilm *in vitro*, hydrophilic characteristics, acidic characteristics and high cell adhesion. In this regard, it is noteworthy that the biofilm formation mechanism is complex and multifactorial; thus, more investigation is necessary to identify and characterize the composition and properties of the bacterial cell wall and to comprehend the totality of its role in the biofilm formation associated with several types of biotic and/or abiotic surfaces.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to declare.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr^a Barbara Iglewski and Dr^a Johana Schwingel from School of Medicine and Dentistry, University of Rochester Medical Center by the kind donation of *P. aeruginosa* PA01.

REFERENCES

- [1] Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998;11:589–603.
- [2] Spencer RC. Predominant pathogens found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996;15:281–85.
- [3] Johnson JG, Murphy CN, Sippy J, Johnson TJ, Clegg S. Type 3 Fimbriae and Biofilm Formation Are Regulated by the Transcriptional Regulators MrkHI in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*. 2011;193:3453–60.
- [4] FINE D. Advancing oral health through industry/academic partnerships. *UMDNJ-New Jersey Dental School*. 2005;6:7-8.
- [5] Schachter B. Slimy business - the biotechnology of biofilms. *Nat. Biotechnol*. 2003;21:361-65.
- [6] Sanchez CJ, Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, Murray CK. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infectious Diseases*. 2013;13:47.
- [7] Driffield K, Miller K, Bostock M, O'Neill AJ, Chopra I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61:1053–56.
- [8] Molin S, Tolker-Nielsen T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol*. 2003;14:255–61.
- [9] Baskin H, Dogan Y, Bahar IH, Yulug N. Effect of subminimal inhibitory concentrations of three fluoroquinolones on adherence of uropathogenic strains of *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents*. 2002;19:79–82.

- [10] Vranes J. Effect of subinhibitory concentrations of ceftazidime, ciprofloxacin and azithromycin on the hemagglutination and adherence of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Chemotherapy*. 1996;42:177–85.
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 22th Informational Supplement. CLSI document M100–S22. Wayne, PA: CLSI; 2012.
- [12] Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*. 1989;42:872-874.
- [13] Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Cervellati M, Donati E, Montanaro L. Detection of slime production by means of an optimized Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. *Biomaterials*. 2002;23:4233-9.
- [14] Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol*. 2005; Chapter 1: Unit 1B.1.
- [15] Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukiv S, Cirkovic I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007;15:891-99.
- [16] Del Re B, Busetto A, Vignola G, Sgorbati B, Palenzona DL. Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain. *Lett Appl Microbiol*. 1998;27:307–10.
- [17] Zárate G, Ambrosini VIM, Chaia AP, Gonzalez SN. Adhesion of Dairy Propionibacteria to Intestinal Epithelial Tissue In Vitro and In Vivo. *Journal of Food Protection*. 2002;65:534–39.

- [18] Bellon-Fontaine MN, Rault J, Van Oss CJ. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1996;7:47-53.
- [19] Blanco MT, Morales JJ, Lucio L, Pérez-Giraldo C, Hurtado C, Gómez-García AC. Modification of adherence to plastic and to human buccal cells of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by a subinhibitory concentration of itraconazole. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21:69–72.
- [20] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001;358:135–38.
- [21] Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J. Rapid Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City. *Arch Intern Med*. 2005;165:1430-35.
- [22] Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*. 2000;182:2675-79.
- [23] Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microb Rev*. 2005;18:657-86.
- [24] Yang D, Zhang Z. Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum β -lactamases. *J Hosp Infect*. 2008;68:369-71.
- [25] Knobloch JK, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol*. 2002;191:101–06.
- [26] Kouidhi B, Zmantar T, Hentati H, Bakhrouf A. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. *Microbial Pathogenesis*. 2010;49:14-22.

- [27] Agerer F, Lux S, Michel A, Rohde M, Ohlsen K, Hauck CR. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. *J Cell Sci.* 2005;118:2189-200.
- [28] Hauck CR, Agerer F, Muenzner P, Schmitter T. Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection. *Eur J Cell Biol.* 2006;85:235-42.
- [29] Sonbol FI, El-Banna TE, Abdelaziz AA, Al-Madboly LA. Conjugative plasmid mediating adhesive pili in virulent *Klebsiella Pneumonia* isolates. *Archives of Clinical Microbiology.* 2012;3:1-10.
- [30] Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology.* 1995;49:711-45.
- [31] Vesterlund S, Paltta J, Karp M, Ouwehand AC. Measurement of bacterial adhesion in vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods.* 2005;60:225-33.
- [32] Pérez PF, Minnaard Y, Disalvo EA, De Antoni GL. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64:21–6.
- [33] Lahtinen S, Ouwehand A, Collado MC, Salminen S, Vesterlund S, Tang M, Satokari R. Mechanisms of Probiotics. In: Lee YK, Salminen S, editors. *Handbook of probiotics and prebiotics.* 2nd Ed. Hoboken, N.J.: John Wiley and Sons. 2008. 386.
- [34] Ziebuhr W, Heilmann C, Gotz F, Meyer P, Wilms K, Straube E, Hacker J. Detection of intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infection and immunity.* 1997;65:890-96.

Table 1- Relationships between aggregation state, hydrophobicity, slime production, adherence state and adherence to epithelial cells

Strains	Site	Aggregation state	Hydrophobicity/basic and acid	Biofilm	Production	Biofilm state	Cellular adhesion
			characteristics state	phenotype CRA	of slime		n° of bacteria/100cells ± SD
KP1	QTA ^a	Non-autoaggregation	Average hydrophobic/basic	Almost-black	Producer	Moderate	626 ± 48.0
KP2	Urine	Non-autoaggregation	Highly hydrophilic/basic	Almost-black	Producer	Moderate	500.5 ± 71.4
KP3	Blood	Non-autoaggregation	Highly hydrophilic/acidic	Reddish-black	Producer	Moderate	547 ± 32.5
KP4	Blood	Non-autoaggregation	Highly hydrophobic/basic	Almost-black	Producer	Moderate	734 ± 156.9
KP5	Sputum	Non-autoaggregation	Highly hydrophilic/acidic	Reddish-black	Producer	Strong	1440 ± 132.9
KP6	Blood	Non-autoaggregation	Highly hydrophilic/acidic	Reddish-black	Producer	Moderate	403.5 ± 33.2
KP7	Sputum	Non-autoaggregation	Highly hydrophilic/acidic	Almost-black	Producer	Moderate	685.5 ± 38.8
KP8	PF ^b	Non-autoaggregation	Highly hydrophilic/acidic	Almost-black	Producer	Moderate	566 ± 182.4
KP9	Catheter	Non-autoaggregation	Highly hydrophilic/acidic	Almost-black	Producer	Strong	1004.5 ± 70.0
KP10	QTA ^a	Non-autoaggregation	Average hydrophobic/acidic	Black	Producer	Strong	139 ± 15.5
KP11	Urine	Non-autoaggregation	Highly hydrophilic/basic	Black	Producer	Moderate	1423 ± 250.3
KP12	Blood	Non-autoaggregation	Highly hydrophilic/undetermined	Almost-black	Producer	Moderate	524 ± 103.2
KP13	Urine	Non-autoaggregation	Highly hydrophilic/undetermined	Reddish-black	Producer	Moderate	901.5 ± 71.4
KP14	BAL ^c	Non-autoaggregation	Highly hydrophilic/acidic	Almost-black	Producer	Moderate	501.5 ± 27.5

^a Quantitative Tracheal Aspirate

^b Peritoneal Fluid

^c Bronchoalveolar Lavage

Table 2 - Surface hydrophobicity (%) of *K. pneumoniae* strains

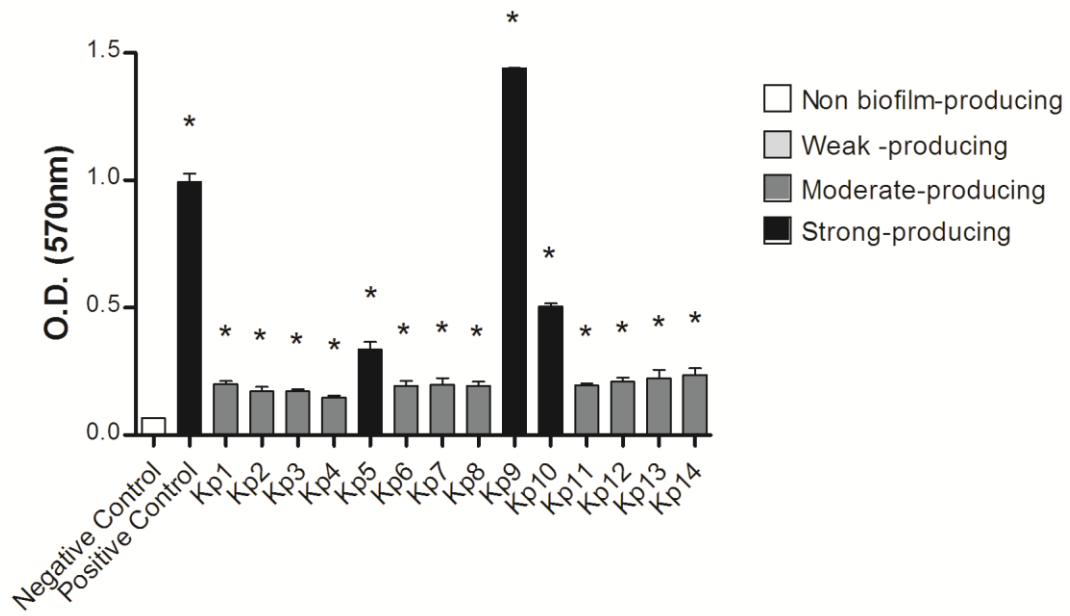
Strains	Percentage of hidophobicity \pm SD		
	Ethyl acetate	p-xylene	chloroform
KP1	13.5 \pm 0.1	31.5 \pm 0.2	33.8 \pm 0.1
KP2	0.5 \pm 0.4	20.7 \pm 0.1	36.9 \pm 2.0
KP3	35.2 \pm 3.1	22.9 \pm 1.9	22.7 \pm 2.5
KP4	31.2 \pm 0.1	25.5 \pm 0.3	40.7 \pm 3.4
KP5	38.3 \pm 1.4	5.7 \pm 1.5	20.3 \pm 1.8
KP6	40.5 \pm 0.2	26.2 \pm 3.9	26.1 \pm 2.3
KP7	34.5 \pm 0.8	8.8 \pm 0.7	19.9 \pm 0.3
KP8	34.0 \pm 2.2	9.3 \pm 1.8	22.5 \pm 3.1
KP9	43.2 \pm 0.8	22.9 \pm 3.9	26.2 \pm 3.4
KP10	45.2 \pm 0.7	30.5 \pm 3.5	31.0 \pm 0.8
KP11	12.5 \pm 5.6	23.1 \pm 4.4	28.5 \pm 0.2
KP12	0	10.4 \pm 0.5	4.8 \pm 0.5
KP13	12.4 \pm 5.7	19.3 \pm 4.8	24.1 \pm 5.0
KP14	31.1 \pm 0.7	18.6 \pm 4.0	20.0 \pm 1.7

List of Figures

Figure 1 - Biofilm forming ability of multiresistant *K. pneumoniae* strains.

Figure 2- Autoaggregative profile of multiresistant *K. pneumoniae* strains.

Figure 3- Number of adhered bacteria per 100 Buccal Epithelial Cells.



* $p < 0.05$ when compared with the negative control.

Figure 1

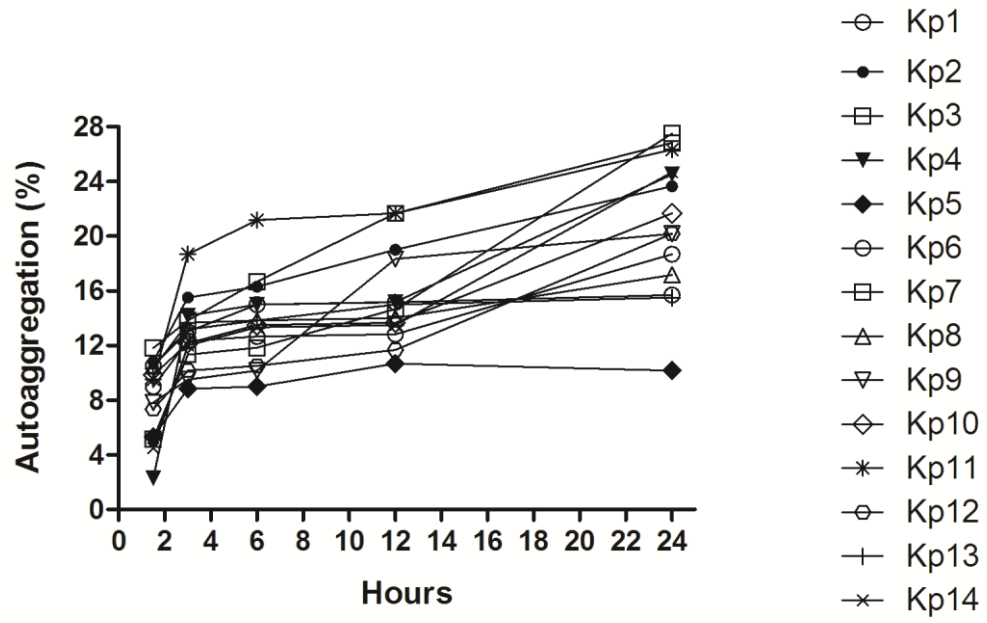


Figure 2

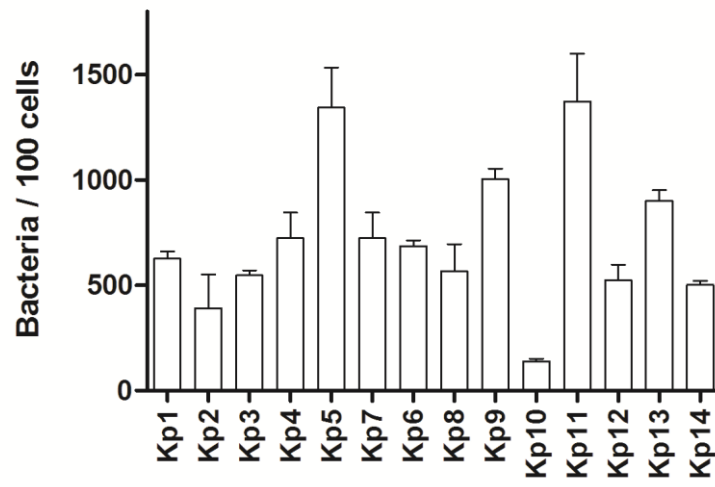


Figure 3

4 DISCUSSÃO

No manuscrito I foram analisadas 33 amostras de *K. pneumoniae* provenientes de isolados clínicos de diversos sítios infecciosos, onde estas amostras apresentaram um perfil de resistência a múltiplos antimicrobianos e susceptibilidade reduzida aos carbapenêmicos. Para a detecção fenotípica de ESBL e carbapenemase, as amostras foram submetidas aos testes do disco combinado com ácido clavulânico e MHT, respectivamente, conforme CLSI (2012). As amostras também foram submetidas à detecção fenotípica de KPC, através da técnica do disco combinado com AB, segundo Tsakris et al (12). Para a detecção do gene *blaKPC* foi estabelecida uma técnica molecular baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR). Dos 33 isolados clínicos analisados através do MHT, 10 amostras (30, 3%) apresentaram uma distorção no halo de inibição do ertapenem, resultando na positividade para o teste de detecção de carbapenemase. O MHT é um teste fenotípico que pode ser utilizado para determinar a sensibilidade reduzida a carbapenêmicos, mediada pela produção de uma carbapenemase. Também tem sido utilizado para avaliar a detecção a resistência mediada por KPC. No entanto, o MHT é um teste muito subjetivo, pois apresenta alta sensibilidade e baixa especificidade (ANDERSON et al., 2007).

Tendo em vista a baixa especificidade do MHT, foi realizado o teste disco combinado com AB para a detecção fenotípica de KPC. Das 33 amostras analisadas, 2 (6,1%) apresentaram positividade para o teste do AB, caracterizadas como produtoras de KPC. Os testes fenotípicos podem ser usados para rastreamento de KPC, entretanto, apesar de serem considerados confirmatórios, podem ocorrer casos de falso positivos ou amostras com resultados duvidosos. Desta forma, é importante a detecção destas enzimas através de técnicas de biologia molecular, como a PCR. As amostras (30,3%) que apresentaram positividade para o MHT foram submetidas à PCR para a detecção do gene *blaKPC*. Em nenhum isolado clínico foi detectado o gene *blaKPC*, nem mesmo nas duas amostras que apresentaram positividade para o teste do AB. Esta falha na detecção fenotípica pode ser explicada por vários fatores: A sensibilidade e especificidade das técnicas moleculares, como a PCR é maior do que as técnicas fenotípicas, como MHT e AB; Pode ocorrer a atuação de mecanismos de resistência simultâneos, como por exemplo, a hiperprodução de AmpC e ou ESBL (principalmente CTX-M-2,

mas também CTX-M-15, CTX-M-59) e a expressão reduzida de porinas; Os isolados poderiam estar abrigando outras carbapenemases da classe A, como por exemplo NMC-A, Sme, IMI, e GES (PASTERAN et al., 2009).

Considerando um estudo realizado em 2008, por Yang et al., foi constatado que amostras de *K. pneumoniae* provenientes de escarro e urina de pacientes, têm uma associação significativa com a formação de biofilme e produção de ESBL. Nestas circunstâncias, a utilização de dispositivos médicos de longa permanência deve ser considerada na escolha da terapêutica antimicrobiana adequada. Desta forma, a fim de verificar a capacidade de formação de biofilme, foram analisadas 14 das 33 amostras de *K. pneumoniae* estudadas no primeiro manuscrito, originando o manuscrito II.

No manuscrito II, das 14 amostras isoladas, nenhuma delas apresentou um fenótipo de alta autoagregação, pois todas apresentam índice de autoagregação inferior a 70%. Porém as cepas analisadas apresentaram significativa capacidade de formação de biofilme *in vitro*, características hidrofílicas, características ácidas e alta adesão celular. Vários trabalhos vem demonstrando uma associação positiva entre o perfil autoagregativo e a formação de biofilmes (ZIEBUHR et al., 1997). De fato, quando um microrganismo tem uma característica altamente autoagregativa, este, apresenta maior facilidade para formação de biofilmes.

Estudos têm demonstrado que um grande número de amostras de *K. pneumoniae* apresentam alta capacidade de formação de biofilme. Sanchez et al., 2013 ao compararem a resistência aos antimicrobianos com a capacidade de formação de biofilme, observaram que as amostras capazes de formar biofilme também foram caracterizadas com maior frequência em um fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (MDR).

A provável razão das 14 amostras analisadas neste trabalho serem produtoras de biofilme e produzirem ESBL simultaneamente podem estar associados a: 1) o biofilme é quase invariavelmente uma comunidade microbiana de uma ou mais espécies, e estas espécies podem partilhar o seu material genético a uma frequência e taxas elevadas (WATNICK & KOLTER, 2000); 2) As ESBL podem ser induzidas por uma baixa concentração de agentes antimicrobianos, o que frequentemente ocorre em biofilmes formados, devido à grande quantidade de material extracelular que garante a baixa penetração dos fármacos no biofilme (PATERSON & BONOMO, 2005).

Além da técnica de formação de biofilmes em placas de poliestireno, foi realizado o ensaio para visualização do crescimento microbiano em placas de ágar vermelho congo (CRA) este ensaio vem sendo amplamente utilizado como um método de triagem para a formação de biofilmes (KNOBLOCH et al., 2002). Neste trabalho todas amostras de *K. pneumoniae* estudadas apresentaram positividade para este teste. Corroborando com nossos resultados, Kouidhi et al. 2010, verificou uma grande correlação entre os resultados do CRA e a capacidade formadora de biofilme em placas de poliestireno.

O estudo do processo infeccioso envolve uma grande quantidade de fatores. Neste sentido a capacidade de adesão bacteriana às células hospedeiras é considerada uma das primeiras etapas para a colonização e a subsequente infecção (AGERER et al., 2005; HAUCK et al., 2006). Sandobol et al., 2012 verificaram que pili do tipo 3 são frequentemente encontrados na superfície de amostras de *K. pneumoniae*. Tais estruturas medeiam a fixação das bactérias às células hospedeiras, sendo codificadas por genes plasmídeos. Além disto, estes plasmídeos podem ser facilmente transferidos por conjugação. Este fato poderia explicar o alto índice de adesão às células epiteliais das amostras com capacidade de formação de biofilme em nosso estudo.

A adesão bacteriana pode ser dividida em estágios primários e secundários. O primeiro estágio é reversível e é determinado por variáveis físico-químicas, como forças de van der Waals, interações ácidos e bases de Lewis, temperatura e forças hidrodinâmicas. Estas variáveis vão determinar a adesão entre duas superfícies: a célula bacteriana e a superfície de interesse. Na adesão secundária, ocorre uma mediação molecular entre adesinas específicas e superfície, em que o microrganismo consolida sua adesão através da produção de um complexo de exopolissacarídeo e/ou ligando receptores específicos presentes na pili com a superfície do material. No final deste estágio, a adesão é irreversível (COSTERTON, CHENG e JEESEY, 1995; VESTERLUND et al., 2005) Para estudos de aderência microbiana, portanto, é essencial conhecer as propriedades físico-químicas do microrganismo, incluindo características de hidrofobicidade e características ácido/básica de Lewis.

No presente estudo, as características superficiais ácidas ou básicas das amostras de *K. pneumoniae* foram estudadas através da aferição da partição de células entre a fase aquosa e o clorofórmio ou acetato de etila. A maioria das

amostras (8, 57.1%) apresentou uma maior afinidade para o acetato de etila, um solvente básico e doador de elétrons, enquanto que 4 amostras (28.5%) demonstraram afinidade para o clorofórmio (um solvente ácido e receptor de elétrons). A forte afinidade para o solvente básico indica que a *K. pneumoniae* tem caráter ácido. Além disso, estas amostras mostraram afinidade simultaneamente para os três hidrocarbonetos. A afinidade por um solvente não exclui a afinidade simultânea por outro, sugerindo uma grande complexidade da superfície celular bacteriana. Praticamente todas as amostras apresentaram um caráter altamente hidrofílico, tendo em vista a baixa afinidade para o xileno. Muitos dos estudos sobre a superfície química da célula microbiana revelaram que a presença de material proteico na superfície da célula resulta em maior hidrofobicidade, ao passo que superfícies hidrofílicas estão associados com a presença de polissacarídeos (PÉREZ et al., 1998; LAHTINEN et al., 2008).

Neste sentido, cabe ressaltar que o mecanismo de formação de biofilmes é complexo e multifatorial portanto mais estudos se fazem necessários para identificar e caracterizar a composição e propriedades da parede celular bacteriana para compreender a totalidade de seu papel na formação de biofilmes associadas a vários tipos de superfícies bióticas e/ou abióticas.

5 CONCLUSÕES

- Através de testes fenotípicos, foi verificado que 10 amostras apresentaram positividade para o MHT e duas amostras foram positivas para o teste do AB.
- Utilizando a técnica de PCR não foi observada a presença do gene *bla_{KPC}* nas amostras analisadas, indicando uma falha na identificação fenotípica de KPC.
- Todas as amostras apresentaram capacidade de formação de biofilme *in vitro*, características hidrofílicas/ácidas e um perfil altamente adesivo a células epiteliais bucais, mostrando uma associação positiva entre altos índices de resistência aos antimicrobianos e capacidade de adesão a superfícies bióticas e abióticas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGERER, F.; LUX, S.; MICHEL, A.; ROHDE, M.; OHLSEN, K.; HAUCK, C.R. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. **Journal of Cell Science**, v.118, p.2189-2200, 2005.

AN, Y. H.; DICKINSON, R. B.; DOYLE, R. J. (2003) **Handbook of Bacterial Adhesion**. New York: Humana Press, 2000. 1-27.

ANDERSON, K. F.; LONSWAY, D. R.; RASHEED, J. K.; BIDDLE, J.; JENSEN, B.; MCDUGAL, L. K.; CAREY, R. B.; THOMPSON, A.; STOCKER, S.; LIMBAGO, B.; PATEL, J. B. Evaluation of Methods To Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.8, p.2723-2725, 2007.

BRATU, S.; LANDMAN, D.; HAAG R.; RECCO, R.; ERAMO, A.; ALAM, M.; QUALE, J. Rapid Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City. **Archives of Internal Medicine**, v.165, p.1430-1435, 2005 [a].

BRATU, S.; TOLANEY, P.; KARUMUDI, U.; QUALE, J.; MOOTY, M.; NICHANI, S.; LANDMAN, D. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.128–132, 2005 [b].

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Mc Graw Hill, v.11, 11ª edição, 2006, p.983-997.

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

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.499-511, 2003.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 22th informational supplement. M100–S22. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2012.

CORNAGLIA, G.; GIAMARELLOU, H.; ROSSOLINI, G. M. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? **Lancet Infectious Diseases**, v.11, p.381-393, 2011.

COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESSEY, G.G. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v.49, p.711-745, 1995.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **American Society for Microbiology**, v.64, n.4, p.847-867, 2000.

DONLAN, R. M. Biofilms and Device-Associated Infections. **Emerging Infectious Diseases journal**, v.7, n.º2, 2001.

DUIN, D.; KAYE, K. S.; NEUNER, E. A.; BONOMO, R. A. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.75, p.115-120, 2013.

DUNNE W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Clinical Microbiology Reviews**. v.15, p.155-166, 2003.

FROST, T.S; LEPLAE, R.; SUMMERS, A.O; TOUSSAINT, A. Mobile Genetic Elements: The Agents of Open Source Evolution. **Nature reviews Microbiology**, v. 3, p. 722-732, 2005.

GÜLMEZ, D.; WOODFORD, N.; ALEPOU, M-F I. P.; MUSHTAQ, S.; METAN, G.; YAKUPOGULLARI, Y.; KOCAGOZ, S.; UZUN, O.; HASCELİK, G.; LIVERMORE, D. M. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. **International Journal of Antimicrobial Agents**, p.1-4, 2008.

HAUCK, C.R.; AGERER, F.; MUENZNER, P.; SCHMITTER, T. Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection. **European Journal of Cell Biology**, v.85, p.235-242, 2006.

HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. **Infection and Immunity**, v.62, p.915-921, 2003.

HOIBYA, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.35, p.322-332, 2010.

KNOBLOCH, J.K.; HORSTKOTTE, M.A.; ROHDE, H.; MACK, D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Medical Microbiology and Immunology**, v.191, p.101-106, 2002.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; Jr. WASHINGTON, C. W. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**, v.5, 5.ed. Medsi, 2001, p.214-217, 795-814.

KOUIDHI, B.; ZMANTAR, T.; HENTATI, H.; BAKHROUF, A. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. **Microbial Pathogenesis**, v.49, p.14-22, 2010.

LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A.; COLLADO, M.C.; SALMINEN, S.; VESTERLUND, S.; TANG, M.; SATOKARI, R. Mechanisms of Probiotics. In: Lee YK, Salminen S. **Handbook of probiotics and prebiotics**. 2ª edição, Ed. Hoboken, 2008, p.386.

MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, L.; ROSENBLUETH, M.; SILVA, J.; MARTINEZ, R. How are genes sequence analyses modifying bacterial taxonomy. **International Microbiology**, v.7, p.261-268, 2004.

- MENDES, R. E.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A. C. C.; GALES, A. C. Metallo- β -lactamases. **Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, v.42, n.2, p.103-113, 2006.
- NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infect Disease**, v.9, p.228-236, 2009.
- PASTERAN, F.; MENDEZ, T.; RAPOPORT, M.; GUERRIERO, L.; CORSO, A. Controlling false-positive results obtained with the hodge and masuda assays for detection of class a carbapenemase in species of *Enterobacteriaceae* by incorporating boronic acid. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, p.1323–1332, 2010.
- PATERSON, D.L.; BONOMO, R.A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.48, p.657-686, 2005.
- PÉREZ, P.F.; MINNAARD, Y.; DISALVO, E.A.; DE ANTONI, G.L. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. **Appl Environ Microbiol.**, v.64, p.21-26, 1998.
- PITOUT, J.D.D. The last threat in the war on antimicrobial resistance. **The lancet**, v.10, p.578-579, 2010.
- 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.
- POIREL, L.; NORDMANN, P.; LAGRUTTA, E.; CLEARY, T.; MUNOZ-PRICE, L. S. Emergence of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.3072, 2010.
- QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.3, p.440–458, 2007.
- RASHEED, J. K.; BIDDLE, J. W.; ANDERSON, K. F.; WASHER, L.; CHENOWETH, C.; PERRIN, J.; NEWTON, D. W.; PATEL, J.B. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Type 2 Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme in Clinical Isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* Carrying a Common Plasmid. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.6, p.2066- 2069, 2008.
- ROBLEDO, I. E.; AQUINO, E. E.; SANTÉ, M. I.; SANTANA, J. L.; OTERO, D. M.; LEÓN, C. F.; VÁZQUEZ, G. J. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.1354-1357, 2010.
- ROOLINS, D.M.; JOSEPH, S.W. In: *Enterobacteriaceae*, 2000. Disponível em <http://medic.med.utm.tmc.edu>. Acesso em outubro de 2012.
- SADER, H. S.; JONES, R. N.; GALES A. C.; SILVA J. B.; PIGNATARI A. C. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American And Brazilian Results For 1997 Through 2001. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, n.1, p. 25-79, 2004.

SANCHEZ, C.J.; MENDE, K.; BECKIUS, M.L.; AKERS, K.S.; ROMANO, D.R.; WENKE, J.C.; MURRAY, C.K. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. **BMC Infectious Diseases**, v.13, p.47, 2013.

SONBOL, F.I.; EL-BANNA, T.E.; ABDELAZIZ, A.A.; AL-MADBOLY, L.A. Conjugative plasmid mediating adhesive pili in virulent *Klebsiella Pneumonia* isolates. **Archives of Clinical Microbiology**, v.3, p.1-10, 2012.

SPELLBERG, B.; BLASER, M.; et al. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. **Clinical Infectious Diseases**, v.52, n^o5, p. 397-428, 2011.

STEWART, P.S.; COSTERTON, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v.358, p. 135-138, 2001.

TENOVER, F.C; Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, p. 3-10, 2006.

TSAKRIS, A.; KRISTO, I.; POULOU, A.; THEMELI-DIGALAKI, K.; IKONOMIDIS, A.; PETROPOULOU, D.; POURNARAS, S.; SOFIANOU, D. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, p.362-367,2009.

VERSALOVIC, J.; CARROLL, K. C.; FUNKE, G.; JORGENSE, J. H.; LANDRY, M. L.; WARNOCK, D. W. **Manual of Clinical Microbiology**. v.1, 10. ed. 2011.

VESTERLUND, S.; PALTTA, J.; KARP, M.; OUWEHAND, A.C. Measurement of bacterial adhesion in vitro evaluation of different methods. **Journal of Microbiological Methods**, v.60, p.255-233, 2005.

VILLEGAS, M. V.; LOLANS K.; CORREA A.; SUAREZ C. J.; LOPEZ J. A.; VALLEJO M.; QUINN J. P. et al. First Detection of the Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2 in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.8, p.2880–2882, ago.2006.

WALSH, T.R. Emerging carbapenemases: a global perspective. **International Journal of Antimicrobial Agentes**, v.36, n.3 p.8-14, 2010.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **J Bacteriol**. 2000;182:2675-79. WEI, Z. Q.; DU, X. X.; YU, Y. S.; SHEN, P.; CHEN, Y. G.; LI, L. J. Plasmid-Mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumonia* Isolate from China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.2, p.763-765, 2007.

WOODFORD, N.; ZHANG J.; WARNER M.; KAUFMANN M. E.; MATOS J., MACDONALD A., BRUDNEY D.; SOMPOLINSKY D.; VENEZIA-VON S.; LIVERMORE D. M. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, n^o6, p.1261-1264, 2008.

YANG D, ZHANG Z. Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum β -lactamases. **Journal of Hospital Infection**, v.68, p.369-371, 2008.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J; DOMENECH-SANCHEZ, A; BIDDLE, J. W.; STEWARD, C. D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F. C. Novel Carbapenem-Hydrolyzing b-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumonia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.4, p.1151–1161, 2001.

ZIEBUHR, W.; HEILIMANM, C.; GOTZ, F.; MEYER, P.; WILMS, K.; STRAUBE, E.; HACKER, J. Detection of intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. **Infection and immunity**, v.65, p.890-896, 1997.

ZOBELL, C. E. The influence of solid surface on the physiological activities of bacteria in sea water. **Journal of Bacteriology**, v.33, p.86, 1937.

7 Anexos

7.1 Anexo A – comprovante de submissão de manuscrito I para revista Brazilian Journal of Microbiology


Brazilian Journal of Microbiology




Failure on Phenotypic Identification of KPC

Journal:	<i>Brazilian Journal of Microbiology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Winkler Neto, Carlos Hugo; Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Santos, Roberto; Centro Universitário Franciscano, Programa de Pós-Graduação em Nanociências de Souza, Márcia; Centro Universitário Franciscano, Programa de Pós-Graduação em Nanociências Zamberlan, Daniele; Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica Vaucher, Rodrigo; Centro Universitário Franciscano, Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Vizzotto, Bruno; Centro Universitário Franciscano, Laboratório de Pesquisa em Microbiologia de Campos, Marli Matiko; Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Keyword:	Klebsiella pneumoniae, Carbapenemases, Bacterial Resistance, Boronic Acid, Modified Hodge Test
Section:	Medical Microbiology: Clinical Bacteriology

7.2 Anexo B - Comprovante de submissão de manuscrito II para revista The Brazilian Journal of Infectious Diseases



The Brazilian Journal of
INFECTIOUS DISEASES

Contact us  Help ?

Username: rchrist
Role: Author

Version: EES 2013.1

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Submissions Being Processed for Author Roberto Christ Vianna Santos, Ph.D.

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Cellular adhesion, hydrophobicity and biofilm formation associated with multiresistant <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Mar 18, 2013	Mar 18, 2013	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display results per page.

[<< Author Main Menu](#)