



Place des clones dans la résistance aux antibiotiques chez *Klebsiella pneumoniae*

Alizée Balandraud

► To cite this version:

Alizée Balandraud. Place des clones dans la résistance aux antibiotiques chez *Klebsiella pneumoniae*. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03522610

HAL Id: dumas-03522610

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03522610>

Submitted on 12 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du D.E.S. de Biologie Médicale

Soutenue le 9 juillet 2021

Par **Mme Alizée BALANDRAUD**

Née le 8 décembre 1993 à Marseille

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017
Portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de
Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

Place des clones dans la résistance aux antibiotiques chez *Klebsiella pneumoniae*

----oOo----

JURY :

<u>Président :</u>	Professeur Jean-Marc Rolain
<u>Membres :</u>	Docteur Sophie Baron
	Docteur Grégory Dubourg
	Docteur Frédérique Gouriet

THESE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

PRESENTEE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA
FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

LE 9 JUILLET 2021

PAR

Mme **Alizée BALANDRAUD**

Née le 08 décembre 1993 à Marseille

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017 portant
organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THESE

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TITRE :

**Place des clones dans la résistance aux antibiotiques
chez *Klebsiella pneumoniae***

THESE ARTICLE

JURY :

Président : Professeur Jean-Marc Rolain

Membres : Docteur Sophie Baron

Docteur Grégory Dubourg

Docteur Frédérique Gouriet

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05

Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE

M. Jérémy MAGALON
Mme Carole SIANI

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Thierry AUGIER
M. Edouard LAMY
Mme Alexandrine BERTAUD
Mme Claire CERINI
Mme Edwige TELLIER
M. Stéphane POITEVIN

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Aurélie LEROYER
M. Romaric LACROIX
Mme Sylvie COINTE

MICROBIOLOGIE

Mme Michèle LAGET
Mme Anne DAVIN-REGLI
Mme Véronique ROUX
M. Fadi BITTAR
Mme Isabelle PAGNIER
Mme Sophie EDOUARD
M. Seydina Mouhamadou DIENE

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO
M. Aurélien DUMETRE
Mme Magali CASANOVA
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

ATER

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

Mme Anne-Claire DUCHEZ

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Mélanie VELIER

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. David BERGE-LEFRANC

CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE –
CHIMIE THERAPEUTIQUE

M. Pascal RATHELOT
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE
M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE

Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDER Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC
---	---------------

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE PHARMACIE CLINIQUE	Mme Anaïs MOYON M. Florian CORREARD
---	--

ATER.

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC
----------------------------------	-------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean-Marc ROLAIN,

Merci d'avoir accepté de présider cette thèse. Vous avez toujours su être disponible et patient à mon égard, et vous en suis très reconnaissante. Je tiens à vous remercier d'avoir été présent depuis mon arrivée au sein de l'IHU.

A Madame le Docteur Sophie BARON,

Merci de me faire l'honneur de diriger cette thèse, je n'aurais pas pu espérer mieux. Je tiens particulièrement à te remercier de m'avoir donné goût à la microbiologie, et ce depuis le début de mon enseignement à l'hôpital, avec tant de gentillesse et de disponibilité. Tu as su m'aider et m'encourager sans relâche ces derniers mois. Je suis fière de pouvoir te compter parmi mes amies et te serai éternellement reconnaissante pour le temps que tu m'as accordé.

A Monsieur le Docteur Grégory DUBOURG,

Merci d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Je tiens à te remercier pour toutes les connaissances que tu m'as transmises au laboratoire de bactériologie. Merci également pour le soutien et les conseils que tu as su me donner au cours de toutes ces années. C'est un plaisir de venir travailler en présence de chefs comme toi.

A Madame le Docteur Frédérique GOURIET,

Merci d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Merci pour tout ce que tu m'as appris depuis mon arrivée au laboratoire il y a trois ans. Merci également pour ta bonne humeur, je n'oublierai jamais les semestres passés à tes côtés.

DÉDICACES

Je dédicace cette thèse à mon grand-père, qui m'était si cher et de qui j'étais très proche. Où que tu sois, je sais que tu es fier de moi. J'espère que tu as enfilé ton plus beau bleu de travail pour me regarder.

A ma famille, qui a toujours été là pour moi, dans mes joies comme dans mes peines, et qui surtout possède l'immense capacité de m'endurer depuis tant d'années.

A mon amoureux Boulou, ça ne devait pas être facile tous les jours de me supporter ces derniers mois, moi qui passais du rire aux larmes. Tu as toujours su me rebooster et me redonner le sourire.

A tous mes amis, et surtout à mes co-internes, avec qui je partage cette aventure depuis maintenant trois ans. En particulier merci à Fleur (parce que c'est ma préférée vu que c'est une fleur), à Marceau (parce qu'il m'a forcé), à Sonia, à Nico pour avoir repris mes astreintes du samedi matin à la dernière minute, à Cécilia, à Maëlle, à Estelle, Lucie même si tu es très lente quand tu marches alors qu'on a faim à midi, à Coline comme une coline Mortier comme un mortier, à Sarah et à Endrit (même si tu comprendras pas ce qui est écrit) et à tous les autres... et à Léa ma cheffe chérie, pour que je sois ton interne préférée à tout jamais.

Merci à toute l'équipe de l'IHU que je considère comme ma deuxième famille.

Merci à Bulma, parce que tu es ma fille.

Et merci au cours ju, parce que c'est encore Marceau qui m'a forcé de le remercier.

***« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation
aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être
considérées comme propres à leurs auteurs. »***

Liste des ABRÉVIATIONS	11
INTRODUCTION	12
PRÉSENTATION	14
I. Epidémiologie actuelle de la résistance aux antibiotiques chez <i>K. pneumoniae</i>	14
1. Résistance aux bêta-lactamines	15
2. Résistance aux fluoroquinolones et aux aminoglycosides	25
3. Résistance à la colistine	28
II. Caractérisation d'un clone bactérien : définition et méthodes	30
1. Définition de clone bactérien	30
2. Méthode d'identification des clones	30
a. Techniques phénotypiques :	30
b. Méthodes phénotypiques moléculaires :	31
c. Techniques génomiques :	31
III. Clones de <i>K. pneumoniae</i> multi-résistants à haut risque épidémique	34
BIBLIOGRAPHIE	36
REVUE	44
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	78
RÉSUMÉ	

Liste des Abréviations

BGN :	Bacille Gram Négatif
BLSE :	Béta-Lactamases à Spectre Elargi
BMR :	Bactérie Multi-Résistante
C3G :	Céphalosporine de 3 ^{ème} Génération
C4G :	Céphalosporine de 4 ^{ème} Génération
CC :	Clonal Complex
CG :	Clonal Group
EARS-Net :	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
ECDC :	European Centre for Disease Prevention and Control
EPC :	Entérobactérie Productrice de Carbapénémases
ERC :	Entérobactérie Résistante aux Carbapénèmes
KPC :	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapénémase
LPS :	Lipopolysaccharides
MBL :	Métallo Béta-Lactamase
MLEE :	Electrophorèse multilocus des isoenzymes
MLST :	MultiLocus Sequence Typing
cgMLST :	<i>core genome</i> MLST
rMLST :	<i>ribosomal</i> MLST
wgMLST :	<i>whole genome</i> MLST
NDM :	New-Delhi Métallo-Béta-Lactamase
NGS :	Next Generation Sequencing
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
OXA :	Oxacillinase
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PFGE :	Electrophorèse en champs pulsé
PMQR :	déterminants plasmidiques de résistance aux quinolones
RAPD :	Amplification aléatoire d'ADN polymorphe
RFLP :	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
SBL :	Sérine Béta-Lactamase
SHV :	Sulfhydryl reagent Variable
ST :	Sequence Type
TLG :	Transfert Latéral de Gène

INTRODUCTION

La résistance aux antibiotiques est un problème actuel de santé publique qui touche à la fois la santé humaine, animale et l'environnement. Elle concerne notamment des bactéries pathogènes pour l'homme et est liée à l'utilisation massive et non contrôlée d'antibiotiques dans ces différents écosystèmes (1). Ces dernières années, la diminution du nombre de nouvelles molécules antibiotiques disponibles sur le marché a augmenté le risque de pénurie d'antibiotiques actifs, imposant une meilleure utilisation des antibiotiques en médecine humaine et une limitation de certains antibiotiques en santé animale et dans l'agroalimentaire (2,3). Des systèmes de surveillance des bactéries les plus fréquemment résistantes à des antibiotiques « clés » ont également été mis en place pour suivre et maîtriser les niveaux de résistance aux antibiotiques au niveau national et international (4).

Cependant, l'émergence de bactéries multi-résistantes (BMR) et la diffusion des gènes de résistance aux antibiotiques n'est pas uniquement liée à l'utilisation généralisée des antibiotiques (5). Elle est également favorisée par la capacité des agents pathogènes à échanger des éléments génétiques de résistance et de virulence. Le transfert latéral de gènes (TLG) est le plus souvent médié par des plasmides, qui jouent un rôle clé dans la propagation de la résistance entre les souches bactériennes (6).

En 2014, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a établi une liste des bactéries les plus fréquemment multi-résistantes et pour lesquelles il devient urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ces bactéries, regroupées sous l'acronyme ESKAPEE, correspondent aux espèces suivantes : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., et *Escherichia coli* (7). Parmi ces espèces bactériennes, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp. et *E. coli* appartiennent à la famille des entérobactéries et présentent des taux croissants de résistance aux antimicrobiens (8). Plusieurs études ont montré que les résistances aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) et aux carbapénèmes sont associées à un retard dans la mise en place d'un traitement efficace, à l'allongement des séjours en unité de soin et conduisent à une augmentation du taux de mortalité (9–11). Le transfert de plasmides joue un rôle central dans la diffusion des gènes de résistance dans cette famille, les souches multi-résistantes pouvant accumuler plusieurs plasmides de résistance dans leur cytoplasme, et ces plasmides pouvant contenir de multiples gènes de résistance et des éléments génétiques mobiles (12,13). Cependant, la dissémination des gènes de résistance peut également résulter de l'expansion de clones multi-résistants (14). C'est ce dernier mode de diffusion de la

résistance aux antibiotiques qui nous intéressera dans cette thèse, et nous nous intéresserons plus particulièrement au rôle de ces clones chez l'espèce *K. pneumoniae*. Cette bactérie à Gram négatif est fréquemment responsable d'infections communautaires mais surtout nosocomiales, à type d'infections urinaires, intra-abdominales, de pneumonies, septicémies ou encore d'infections sur site opératoire (15). Bien que les deux modes de transmission précédemment cités se produisent simultanément, la diffusion de la résistance aux antibiotiques chez *K. pneumoniae* par l'expansion de clones épidémiques à haut risque est un phénomène qui prend de plus en plus d'ampleur ces dernières années (16,17).

Contrairement à d'autres entérobactéries, telle qu'*E. coli* où les taux de résistance ont tendance à se stabiliser voire à diminuer pour certaines classes d'antibiotiques comme les carbapénèmes, nous avons observé une réelle accentuation de la fréquence de la résistance chez *K. pneumoniae* ces derniers années (4). Cette entérobactérie présente certaines caractéristiques telles que la plasticité de son génome, sa capacité à provoquer des infections nosocomiales sévères et à perdurer dans l'environnement, qui peuvent expliquer le succès de l'émergence et de la diffusion des souches multi-résistantes (18). Au sein de cette espèce, certains complexe clonaux (CC) multi-résistants, tels que le CC258 ou le CC307 ont émergé et ont diffusé à l'échelle mondiale (19,20). Ces clones sont porteurs de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE), de carbapénémases et sont parfois associés à la résistance à la colistine, rendant le traitement des infections cliniques à ces germes difficiles (16). La raison de leur succès et leur association avec certains plasmides porteurs de gène de résistances reste incertaine, cependant leur capacité à diffuser rapidement est indiscutable (21).

D'autres études ont également démontré l'émergence de clones hypervirulents mais sensibles aux antibiotiques dans le milieu communautaire. Cependant, l'augmentation du nombre d'études mettant en évidence des clones hypervirulents multi-résistants constitue un risque de santé public important (22).

L'objectif de cette thèse était de réaliser une revue bibliographique des principaux complexes clonaux internationaux multirésistants chez *K. pneumoniae* et d'identifier les facteurs associés à ces complexes. Dans une première partie, nous rappelons l'épidémiologie de la résistance aux antibiotiques et des gènes de résistance associés chez *K. pneumoniae*. Dans une seconde partie, nous rappelons la définition du clone bactérien et les méthodes utilisées pour le décrire. Enfin la troisième partie de cette thèse consiste en une revue bibliographique des clones multi-résistants internationaux de *K. pneumoniae*. Cette mini-revue a été commandée par le journal International Journal of Antimicrobial Agents dans le cadre d'une édition spéciale sur les clones bactériens et la résistance aux antibiotiques.

PRESENTATION

I. Epidémiologie actuelle de la résistance aux antibiotiques chez *K. pneumoniae*

K. pneumoniae présente différents gènes de résistance chromosomiques, lui conférant une résistance intrinsèque à certains antibiotiques. Parmi eux, on compte la bêta-lactamase de type sulfhydryl reagent variable (SHV) (23), le gène de résistance à la fosfomycine *fosA* (24), et la pompe à efflux OxaAB de résistance aux fluoroquinolones (25). Ces gènes de résistance constituent son résistome intrinsèque, que l'on peut traduire par « l'ensemble des gènes chromosomiques qui sont impliqués dans la résistance intrinsèque et dont la présence dans les souches d'une espèce bactérienne est indépendante d'une exposition antérieure aux antibiotiques et n'est pas due à un transfert latéral de gènes » (26).

Conjointement, *K. pneumoniae* peut acquérir des résistances par mutations chromosomiques ou par acquisition de gènes de résistance par TLG, comme les bêta-lactamases de type oxacilline (OXA), *K. pneumoniae* carbapénémase (KPC) ou New-Delhi Métallo-bêta-lactamase (NDM). Les souches de *K. pneumoniae* peuvent se transmettre entre les différentes niches environnementales, les hôtes humains et/ou animaux, en transportant avec elles des gènes et/ou des plasmides de multi-résistance. Les voies de transmission peuvent se faire par contact ou par consommation de sources d'eau ou de matières végétales contaminées, par consommation de nourriture animale contaminée, ou par diffusion dans l'environnement à partir des effluents ou des égouts. Ces écosystèmes représentent des niches pour l'échange de matériel génétique entre *K. pneumoniae* et un éventail diversifié d'espèces, fournissant ainsi une voie pour le transfert de gènes de résistance des microbes environnementaux aux pathogènes humains (fig. 1) (2).

Les deux dernières décennies ont été marquées par l'augmentation du taux de résistance à de nombreuses classes d'antibiotiques, notamment aux C3G, aux carbapénèmes, mais aussi aux fluoroquinolones et à la colistine (27–30). En Europe, plus du tiers des isolats de *K. pneumoniae* transmis au réseau de surveillance Européen de la résistance aux antibiotiques, l'EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) sont résistantes à au moins une classe d'antibiotiques (4). Ce réseau est le plus grand système de surveillance de la résistance aux antibiotiques en Europe. Il est basé sur les données de routine de sensibilité aux antimicrobiens des laboratoires locaux et cliniques, communiquées à l'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) par des représentants désignés dans chaque état européen.

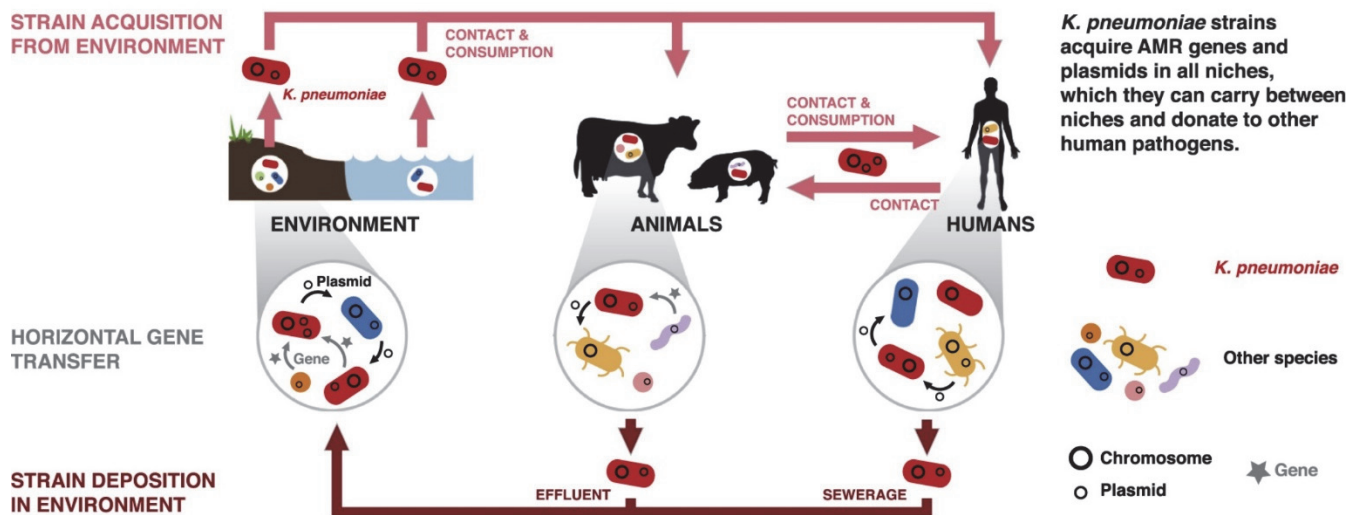


Fig. 1 : Modèle de trafic de gènes et de plasmides multi-résistants par *K. pneumoniae* (2).

1. Résistance aux bêta-lactamines

La résistance aux bêta-lactamines est majoritairement obtenue par hydrolyse du noyau bêta-lactame contenu dans les antibiotiques de la classe des bêta-lactamines, mais aussi par modification de la cible, par imperméabilité cellulaire ou par efflux actif. Chez les entérobactéries, les deux principaux mécanismes de résistance aux bêta-lactamines sont l'acquisition de bêta-lactamases et l'imperméabilité cellulaire. Les bêta-lactamases forment une classe très diverse et hétérogène d'enzymes. Elles sont classiquement réparties selon la classification d'Ambler (31). Cette classification divise les bêta-lactamases en quatre classes distinctes, appelées A, B, C et D (Fig. 2) identifiées sur la base de motifs de séquence spécifiques. Une autre division fondamentale existe entre les trois classes A, C, et D qui sont des protéases sérine (sérine bêta-lactamases ou SBL) et la classe B qui contient un groupe hétérogène de métalloenzymes de zinc (métallo bêta-lactamases ou MBL). Les SBL utilisent cette sérine comme nucléophile de la réaction et hydrolysent les bêta-lactames par un intermédiaire acylenzyme covalent. Les MBL, quant à elles, utilisent un nucléophile aqueux activé par un métal pour conduire la réaction hydrolytique (32).

Ambler molecular classification

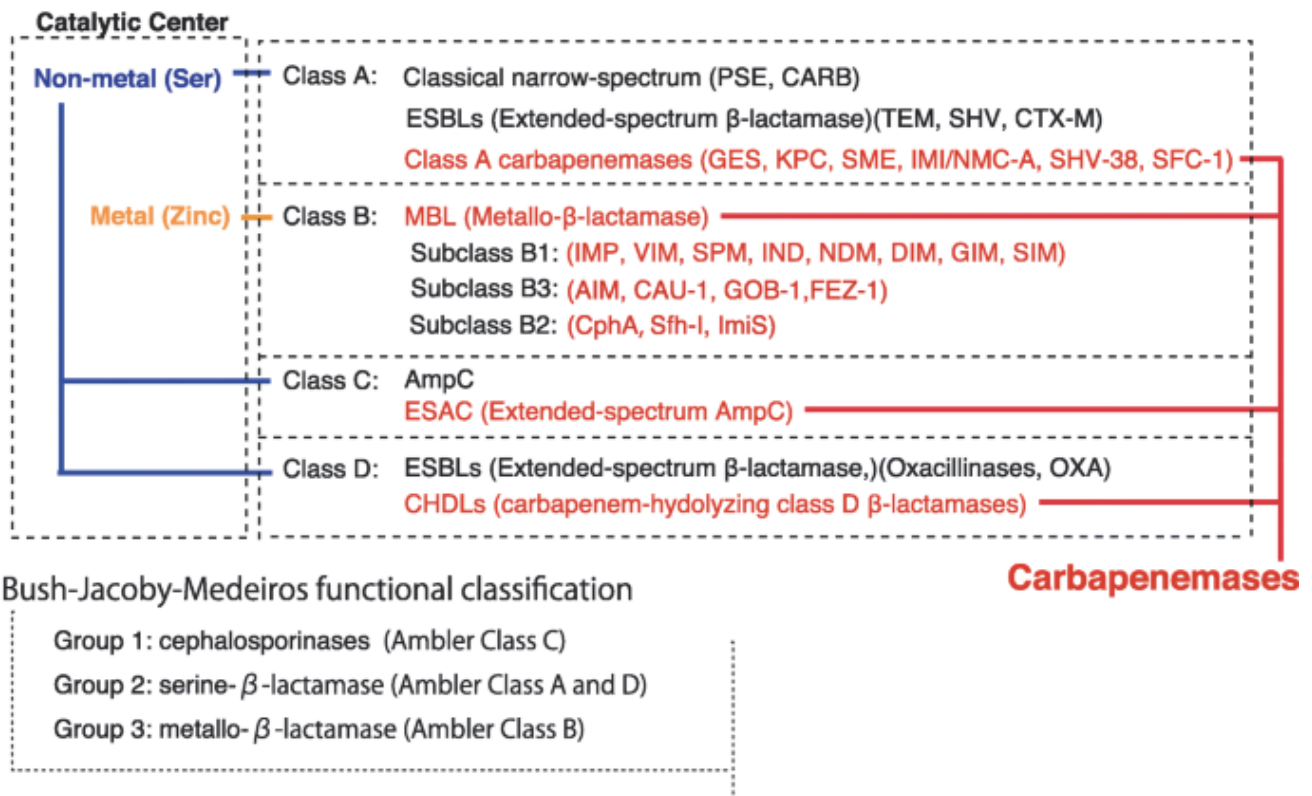


Fig. 2. Classification d'Ambler

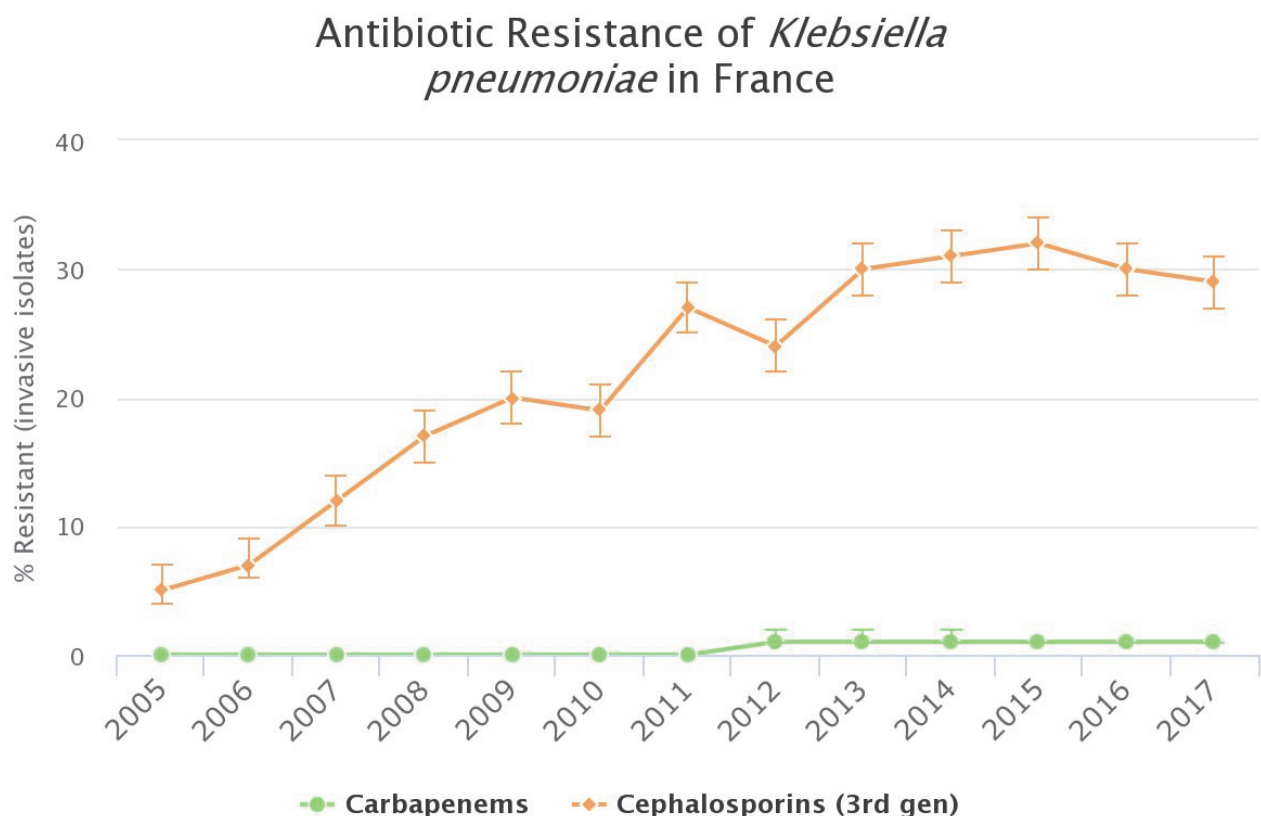
Les BLSE, à l'exception des BLSE de type OXA (classe D) appartiennent à la classe A d'Ambler. Les organismes produisant des BLSE sont résistants à toutes les pénicillines et aux céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} génération ainsi qu'aux monobactames, mais restent sensibles aux carbapénèmes et aux céphamycines. Cette résistance peut être surmontée par l'association d'une bêta-lactamine et d'un inhibiteur de bêta-lactamases. On retrouve les enzymes TEM, SHV et CTX-M qui appartiennent à la classe A d'Ambler, tandis que les oxacillinases appartiennent à la classe D. Parmi les oxacillinases, on retrouve des enzymes présentant un spectre d'activité très varié. Les enzymes telles qu'OXA-11 et OXA-15 par exemple, ont une activité de type BLSE.

Les bêta-lactamases de type AmpC appartiennent à la classe C d'Ambler. Elles sont codées par le gène *ampC*, présent sur le chromosome des entérobactéries du groupe 3. Ces organismes sont résistants à tous les antibiotiques auxquels les producteurs de BLSE sont résistants, ainsi qu'aux céphamycines (par exemple, la céfoxitine). Ils restent cependant sensibles aux carbapénèmes.

Les carbapénémases sont réparties dans les différentes classes de la classification d'Ambler, à l'exception de la classe C. La classe A contient les enzymes de type KPC, les Métallo bêta-lactamases appartiennent à classe B tandis que la classe D contient les oxacillinases de type OXA-48 et OXA-23 par exemple. Ces organismes sont classiquement résistants à tous les antibiotiques auxquels les producteurs de bêta-lactamase AmpC sont résistants, et ils sont également résistants aux carbapénèmes. Il existe cependant des exceptions, comme les enzymes OXA-48 qui ont une très faible activité envers les C3G et les C4G (33).

- Résistance aux C3G

Le niveau de résistance aux C3G chez *K. pneumoniae* a significativement augmenté entre 2005 et 2010 en France et en Europe, d'après les rapports de l'EARS (34,35), passant de 4.9% en 2005 à 19.3% en 2010 en France. Depuis 2015, il n'y a pas eu d'augmentation significative de la résistance aux C3G observée en Europe (27,35) (Fig. 3).



Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (cddep.org)

Fig. 3 : Evolution des taux de résistance aux C3G et aux Carbapénèmes chez *K. pneumoniae* en France (<https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php>, consulté le 23/06/2021)

Le taux de résistance était de 31,7% en Europe, et de 30,8% en France en 2018. Ce taux de résistance reste hétérogène dans le monde et en Europe où il peut atteindre des taux plus élevés dans certains pays d'Europe de l'Est comme en Bulgarie où il est de 77.7% ou en Roumanie où il est de 61.4%, ou encore en Grèce où il est de 70,1% (Fig. 4, Fig. 5).

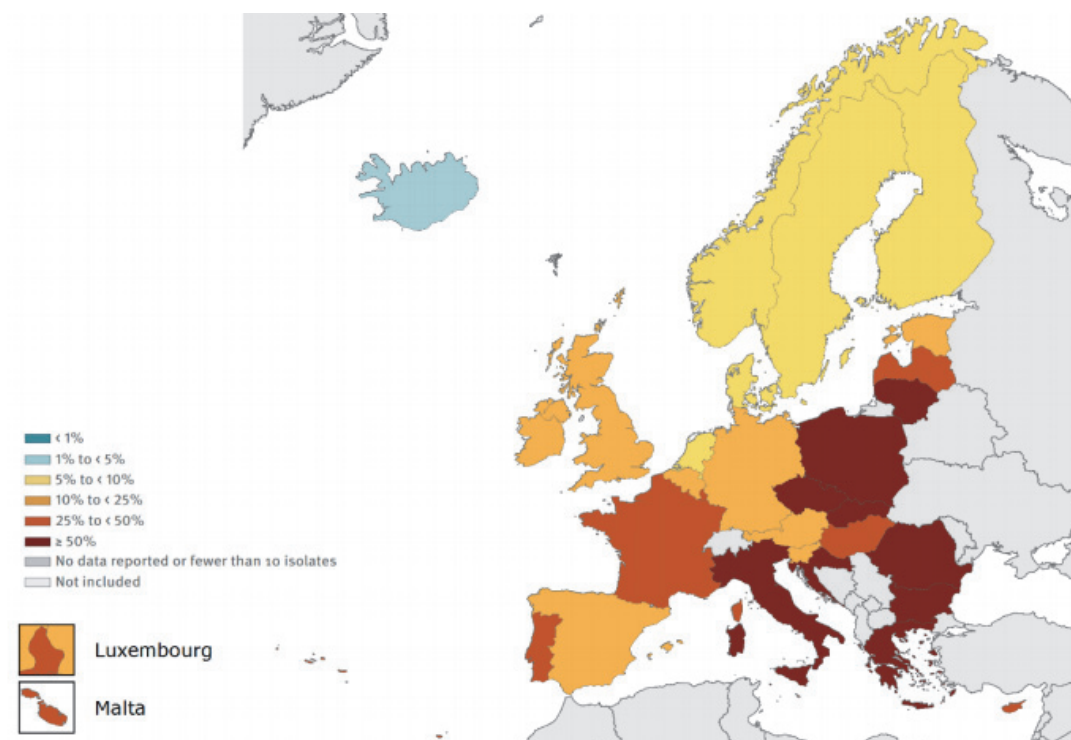
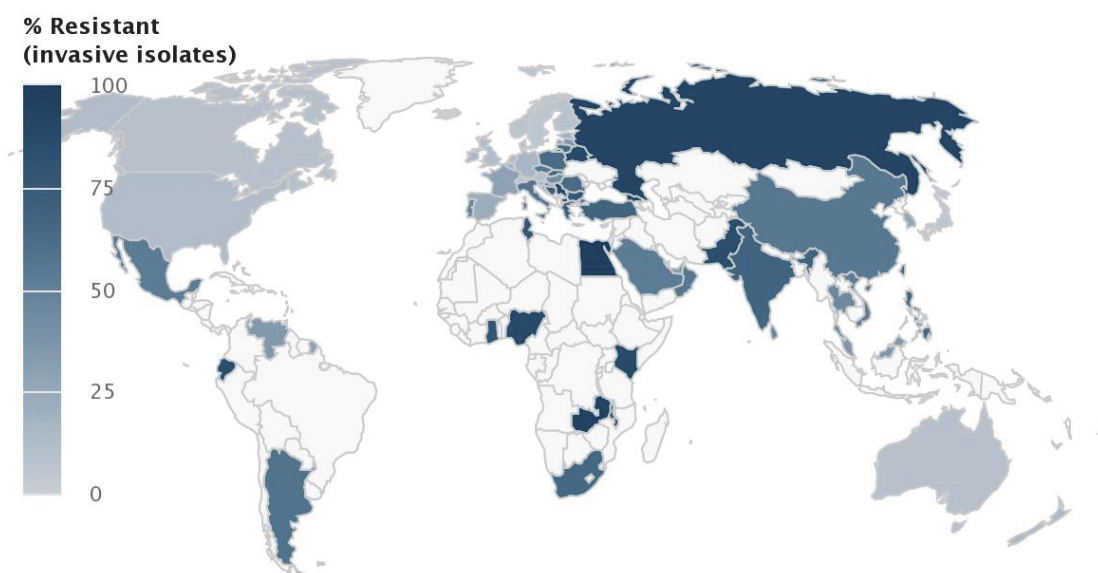


Fig. 4 : Pourcentage (%) d'isolats invasifs de *K. pneumoniae* présentant une résistance aux céphalosporines de troisième génération, par pays, pays de l'UE/EEE, 2019 (SURVEILLANCE REPORT. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2019)

Resistance of *Klebsiella pneumoniae* to Cephalosporins (3rd gen)



Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (cddep.org) © Natural Earth

Fig. 5 : Pourcentage (%) d'isolats invasifs de *K. pneumoniae* présentant une résistance aux C3G par pays dans le monde (<https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php> consulté le 23/06/2021)

La majorité des *K. pneumoniae* résistantes aux C3G produisent des BLSE. D'après les données rapportées à l'EARS en 2017, parmi les *K. pneumoniae* résistantes aux C3G, 87.8% des souches ont été déclarées comme productrices de BLSE.

Des études récentes ont montré que le taux de BLSE chez *K. pneumoniae* était de 30% en Europe, et qu'il n'avait pas augmenté significativement ces dernières années. Ce taux peut varier d'un pays à l'autre : il est de 10% aux États-Unis par exemple, et varie entre 15 et 60% en Asie du Sud-Est (36).

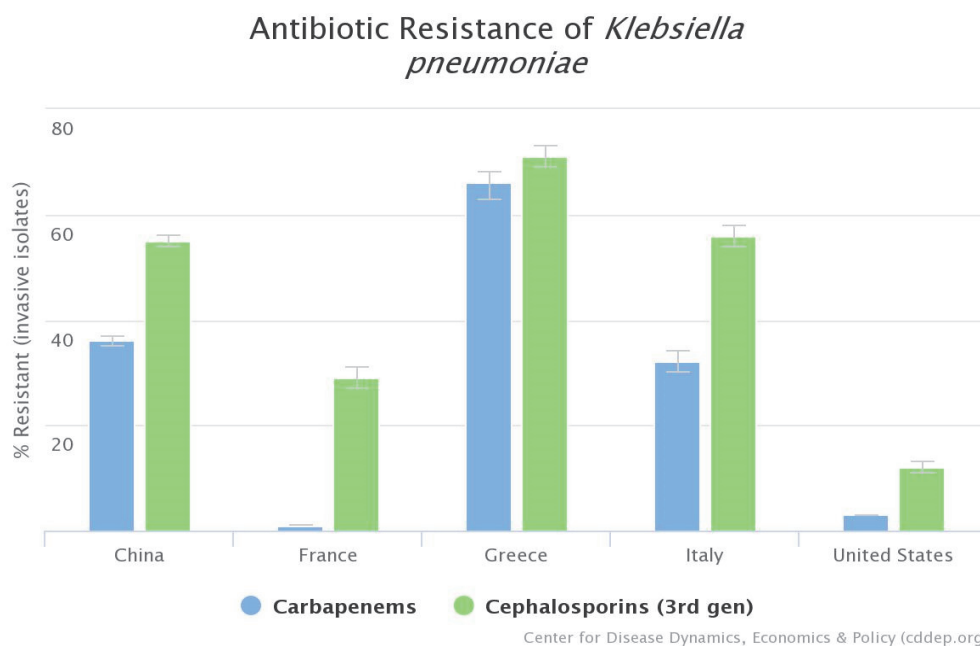


Fig. 6 : Pourcentage (%) de résistance aux carbapénèmes et aux C3G chez *K. pneumoniae* en Chine, France, Grèce, Italie et aux États-Unis (<https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php> consulté le 23/06/2021)

Depuis l'émergence des BLSE chez *K. pneumoniae*, au cours des années 1990-2000, ce pathogène est devenu le principal porteur de BLSE associées aux épidémies nosocomiales.

Le premier gène de BLSE, *bla_{SHV-2}*, fut découvert en 1985 chez *Klebsiella ozaenae*, (37) puis une autre BLSE à médiation plasmidique fut découverte peu de temps après chez *K. pneumoniae* : *bla_{TEM-3}* (38). Initialement, les *K. pneumoniae* portaient majoritairement des bêta-lactamases de type SHV et TEM. Cependant, un changement de type de BLSE a eu lieu au début des années 2000, avec l'acquisition de plasmides et de transposons porteurs de *bla_{CTX-M}*. La production de bêta-lactamases CTX-M devient alors majoritaire (Fig. 6) (39). D'autres BLSE de type oxacillinase (OXA-1, OXA-17...) sont également rencontrées chez *K. pneumoniae* et proviennent du TLG (40). La plasticité génomique de *K. pneumoniae* lui permettant d'intégrer des gènes d'origine chromosomiques sur des plasmides a entraîné l'émergence des céphalosporinases AmpC à médiation plasmidique conférant une résistance aux C3G. Les familles de gènes *bla_{AmpC}* les plus abondantes chez cette espèce appartiennent aux types CMY, DHA, FOX et MOX (16).

- Résistance aux carbapénèmes

La propagation mondiale des BLSE a conduit à la résistance fréquente à toutes les pénicillines et à toutes les céphalosporines, motivant l'utilisation plus accrue des carbapénèmes, ce qui a augmenté la pression de sélection et facilité la propagation des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (ERC) (41). Les carbapénèmes sont des bêta-lactamines possédant un spectre large. Leur activité est liée à la rapidité de pénétration à travers la paroi des bacilles à Gram négatif (BGN), et leur stabilité vis-à-vis de la plupart des bêta-lactamases intrinsèques ou acquises y compris les BLSE et les céphalosporinases AmpC. Chez les entérobactéries, la résistance aux carbapénèmes peut résulter de mécanismes combinés associant une surexpression de céphalosporinases plasmidiques ayant une très faible activité de carbapénémase et une diminution de perméabilité de la membrane externe par modification des porines de type OmpC, OmpF ou OmpK, ou de la présence de véritables carbapénémases (42–44). Ces dernières peuvent appartenir aux classes A, B et D de la classification d'Ambler et être de type KPC, de type métallo-enzymes (VIM, IMP, etc.), ou encore de type oxacillinase, OXA-48 (45). Du fait du risque plus important de transmission par TLG de la résistance aux carbapénèmes par production de carbapénémases, il est important de distinguer les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes par un mécanisme de surexpression de céphalosporinases plasmidiques et d'imperméabilité des entérobactéries productrices de carbapénémases. Les souches productrices de carbapénémases ont diffusé largement ces dernières années et sont associées à un mauvais pronostic chez les patients infectés. Cependant, il est parfois difficile d'estimer la propagation des *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases avec des données sur le taux de résistance aux carbapénèmes, du fait de la faible capacité de certaines enzymes à hydrolyser les carbapénèmes, c'est notamment le cas des OXA-48, et du fait de l'existence d'autres mécanismes de résistance aux carbapénèmes.

Le taux de résistance aux carbapénèmes en 2018 chez *K. pneumoniae* était de 0,5% en France, mais il existe une grande variation de ce taux d'un pays à l'autre (en Europe entre 0 et 63,9%) (Fig. 3). Ce taux a significativement augmenté entre 2015 et 2018, atteignant une prévalence de 7,5% en 2018 en Europe d'après les rapports de surveillance de l'EARS (4). Bien que l'augmentation annuelle du pourcentage moyen de résistance aux carbapénèmes ces 5 dernières années soit plus modérée que les années précédentes, ce taux a été multiplié par 7 depuis 2006 (46). Ce taux est plus élevé chez *K. pneumoniae* que chez les autres entérobactéries (0,1% d'*E. coli* résistants aux carbapénèmes en Europe en 2018). *K. pneumoniae* est devenue l'ERC majoritaire et pose actuellement un problème de santé public majeur dans certains pays comme en Grèce (47) ou en Italie (48).

En 2018, 16 pays d'Europe sur 37 pays participants ont signalé une propagation régionale ou interrégionale d'entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) et 4 pays ont signalé une situation endémique (Fig. 5). L'introduction des EPC par le biais de transferts transfrontaliers de patients ou de voyageurs pourrait contribuer de manière significative à la propagation de ces bactéries dans les pays où la prévalence des EPC est encore faible (49).

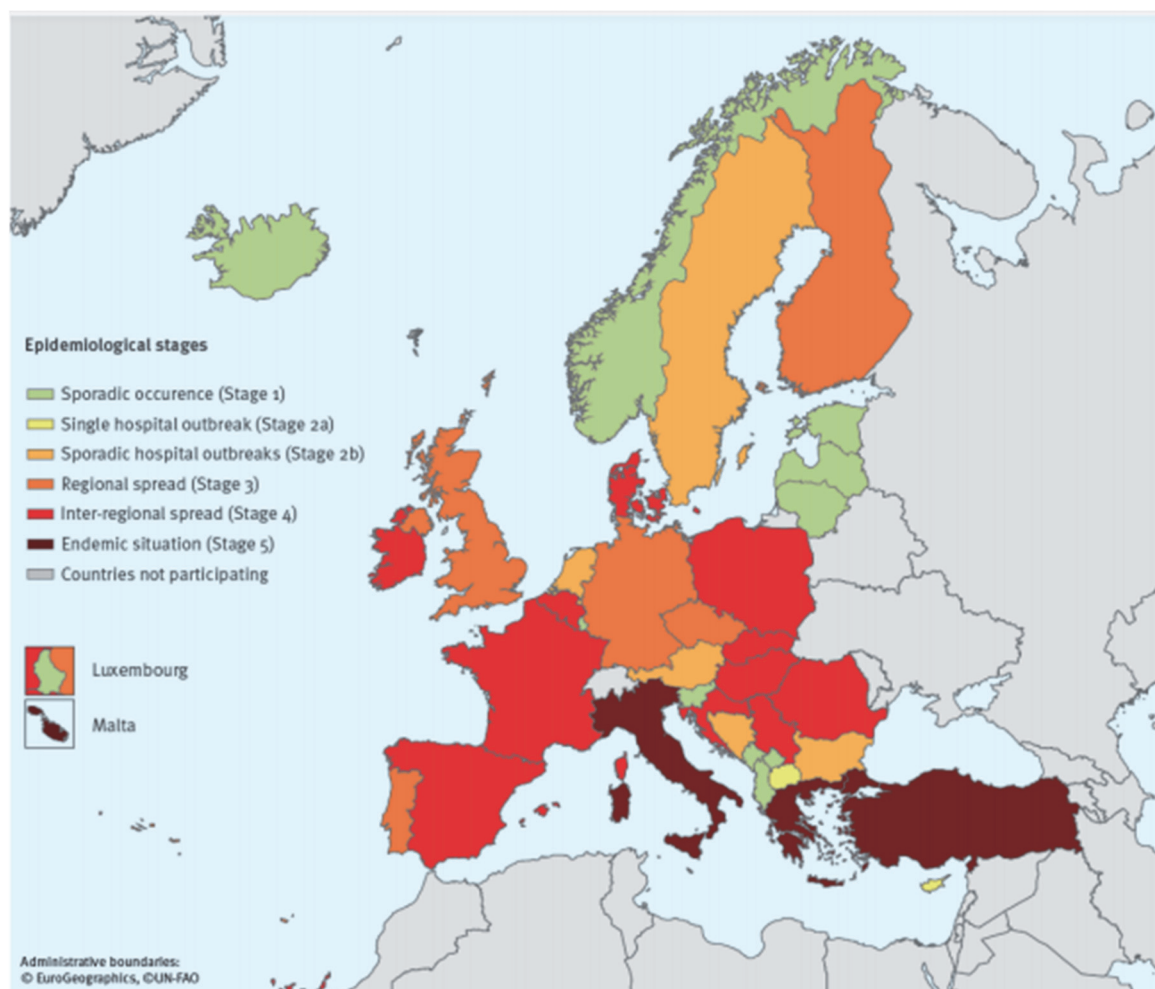
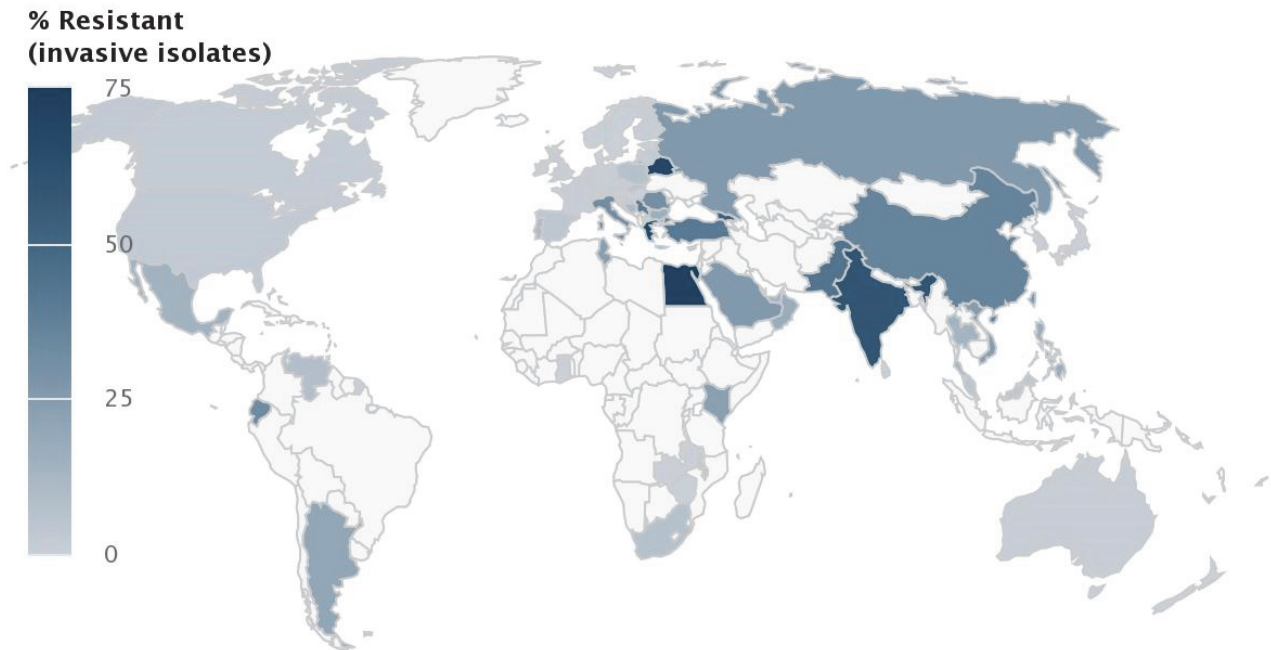


Fig. 7. : EARS-Net : Situation épidémiologique des entérobactéries productrices de carbapénémase, évaluation par des experts nationaux dans les pays européens, juillet 2018 (n=37).

Cette hétérogénéité de prévalence de *K. pneumoniae* résistante aux carbapénèmes s'observe également dans le monde. Depuis leur première identification dans les années 1990s, les *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases ont diffusé au travers des pays et des continents, cependant, l'épidémiologie exacte de leur expansion varie en fonction de la localisation géographique (Fig. 5, Fig. 6) (50).

Resistance of *Klebsiella pneumoniae* to Carbapenems



Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (cddep.org) © Natural Earth

Fig. 8 : *Klebsiella pneumoniae*. Pourcentage (%) d'isolats invasifs présentant une résistance aux carbapénèmes par pays dans le monde (<https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php> consulté le 23/06/2021)

Dans la littérature, les EPC les plus importantes cliniquement sont celles qui produisent des bêta-lactamases de type KPC, IMP/VIM et OXA-48 (45). La première carbapénémase détectée fut la métalloenzyme IMP-1, détectée au Japon dans une souche de *Serratia marcescens* isolée en 1991 (51), 5 ans avant la découverte de l'enzyme KPC aux Etats-Unis dans une souche de *K. pneumoniae* (52,53). Depuis, d'autres gènes de résistance aux carbapénèmes ont été identifiés tels que *bla_{OXA-48}* et *bla_{NDM-1}*, mais *bla_{KPC}* reste indéniablement le gène le plus souvent rencontré chez les *K. pneumoniae* résistants aux carbapénèmes. Les souches arborant *bla_{KPC}* sont présentes sur tous les continents (Fig. 8), *bla_{KPC-2}* et *bla_{KPC-3}* sont les gènes majoritaires (Fig. 9). Mais les gènes de résistances aux carbapénèmes n'ont pas la même prévalence en fonction des pays (Fig. 10). Actuellement, sur le pourtour méditerranéen, les isolats de *K. pneumoniae* producteurs d'OXA-48 sont endémiques en Turquie et à Malte, et diffusent de manière interrégionale en Espagne, en France, en Tunisie, au Maroc, au Liban et en Libye (54). Les *K. pneumoniae* productrices de NDM, elles, sont endémiques en Inde, au Pakistan et au Bangladesh (55).

Les pays présentant les taux de résistance aux carbapénèmes les plus élevés sont également parmi les pays rapportant les pourcentages de résistance les plus élevés pour les autres groupes

d'antimicrobiens. Les antibiotiques qui présentent le plus souvent une activité in vitro contre les EPC sont la colistine, la tigécycline et la fosfomycine, mais leur efficacité suscite des inquiétudes, l'expérience clinique de leur utilisation est limitée du fait des effets indésirables plus fréquents, le développement rapide de la résistance pendant le traitement et l'augmentation de la résistance au niveau mondial (56).

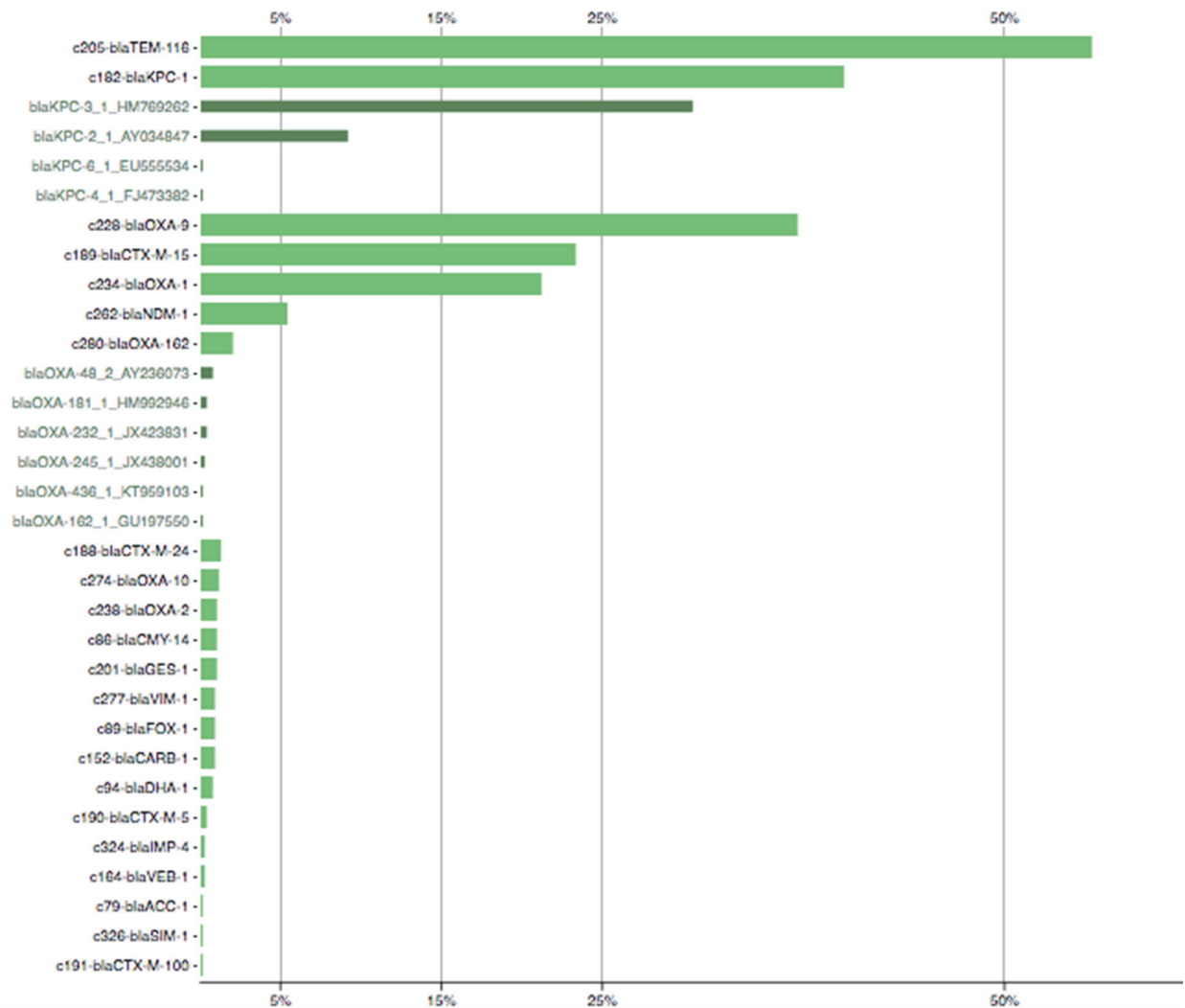


Fig. 9 : Fréquence des gènes de résistance aux β -lactamines retrouvés chez *K. pneumoniae*. Tous les génomes assemblés ont été téléchargés à partir du National Center for Biotechnology Information (NCBI) en 2016 (<http://www.resistome.biosustain.dtu.dk/species.html#573>) consulté le 23/06/2021

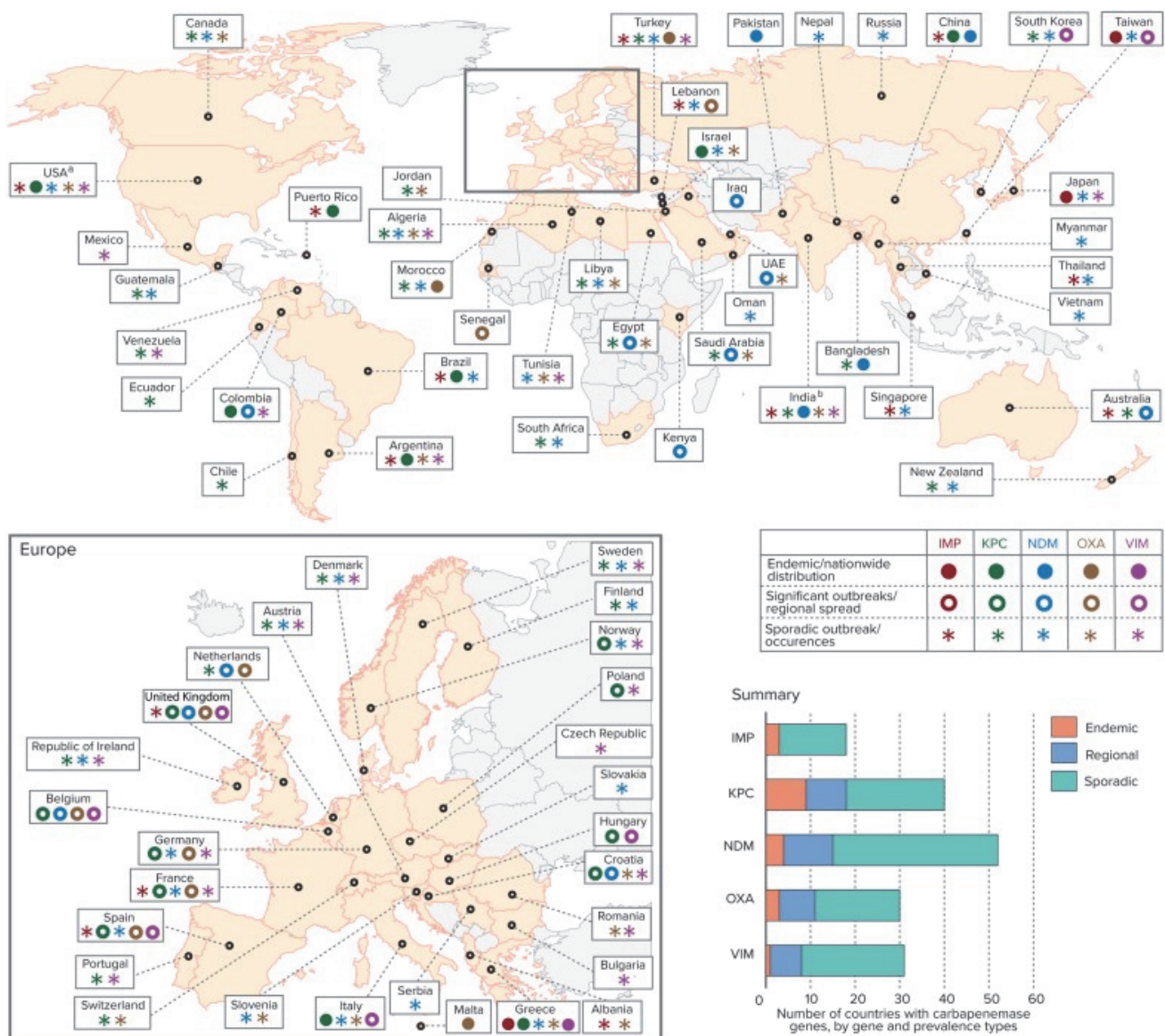


Fig. 10 : Répartition mondiale des carbapénémases dans les entérobactéries, par pays et par région (57)

La propagation des *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases est liée à des lignées clonales spécifiques telles que les ST11, 15, 101, 258/512 et leurs dérivés (20,58–63), qui feront l'objet du chapitre 3 de cette thèse.

2. Résistance aux fluoroquinolones et aux aminoglycosides

L'introduction de l'acide nalixidique et de la norfloxacine (en 1963 et en 1983 respectivement) furent rapidement accompagnées des premières preuves de résistance à l'acide nalixidique et à la norfloxacine chez les BGN (64,65). La résistance aux fluoroquinolones a émergé dans les années 1980s, soit peu de temps avant l'émergence des BLSE.

En Europe entre 2015 et 2018, une augmentation du taux de résistance aux fluoroquinolones a pu être observée, ce taux de résistance est cependant resté stable en France. En 2018, le pourcentage moyen de résistance aux fluoroquinolones pondéré en fonction de la population dans les pays de l'Union Européenne a été signalé à 31,6%, soit le deuxième plus élevé après la résistance aux C3G (4). La résistance aux fluoroquinolones est souvent associée à d'autres résistances, le phénotype de résistance le plus courant étant la résistance aux fluoroquinolones, aux C3G et aux aminoglycosides. Les résistances isolées aux fluoroquinolones sont plus rares.

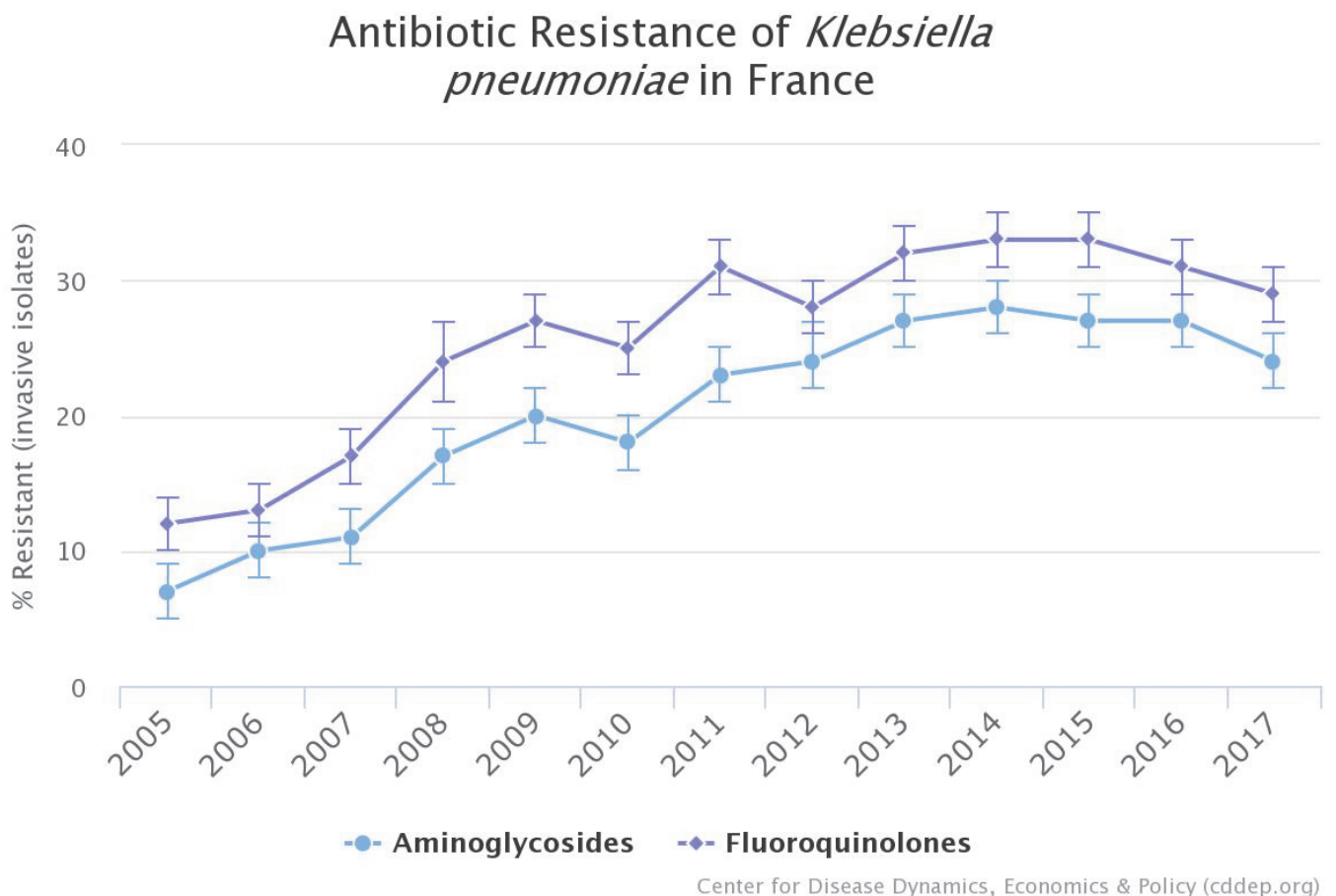


Fig. 11. Evolution du taux de résistance aux Aminosides et aux Fluoroquinolones chez *K. pneumoniae* en France

La résistance aux fluoroquinolones chez *K. pneumoniae* peut être d'origine chromosomique ou d'origine plasmidique (16). Le principal mécanisme de résistance est le résultat de mutations chromosomiques dans les sites de liaison des quinolones, l'ADN gyrase (sous-unités *gyrA-gyrB*) et la topoisomérase IV (sous-unités *parC-parE*). Cependant, *K. pneumoniae* peut également acquérir des déterminants plasmidiques de résistance aux quinolones (PMQR) qui se distinguent par leur mécanisme de résistance. On distingue les protecteurs de cibles *qnr*, les inactivateurs enzymatiques AAC(6')-Ib-cr et les pompes à efflux tel que QepA ou OqxAB (66). OqxAB, qui était initialement considérée comme étant chromosomique, est désormais reconnue comme impliquée dans la résistance aux quinolones médiée par les plasmides (67). Le gène de résistance *aac(6)-Ib-cr* confère une résistance concomitante aux aminosides et aux quinolones. La sélection croisée, notamment aux aminosides et aux C3G est due à la présence concomitante de plusieurs gènes de résistance accompagnant les PMQR. La présence sur des plasmides de *bla_{CTX-M-15}* associée à *aac(6)-Ib-cr* a été mise en évidence dans de nombreux pays (68). Le co-portage de *qnrB* et de *bla_{CTX-M-15}* a également déjà été identifié (69,70).

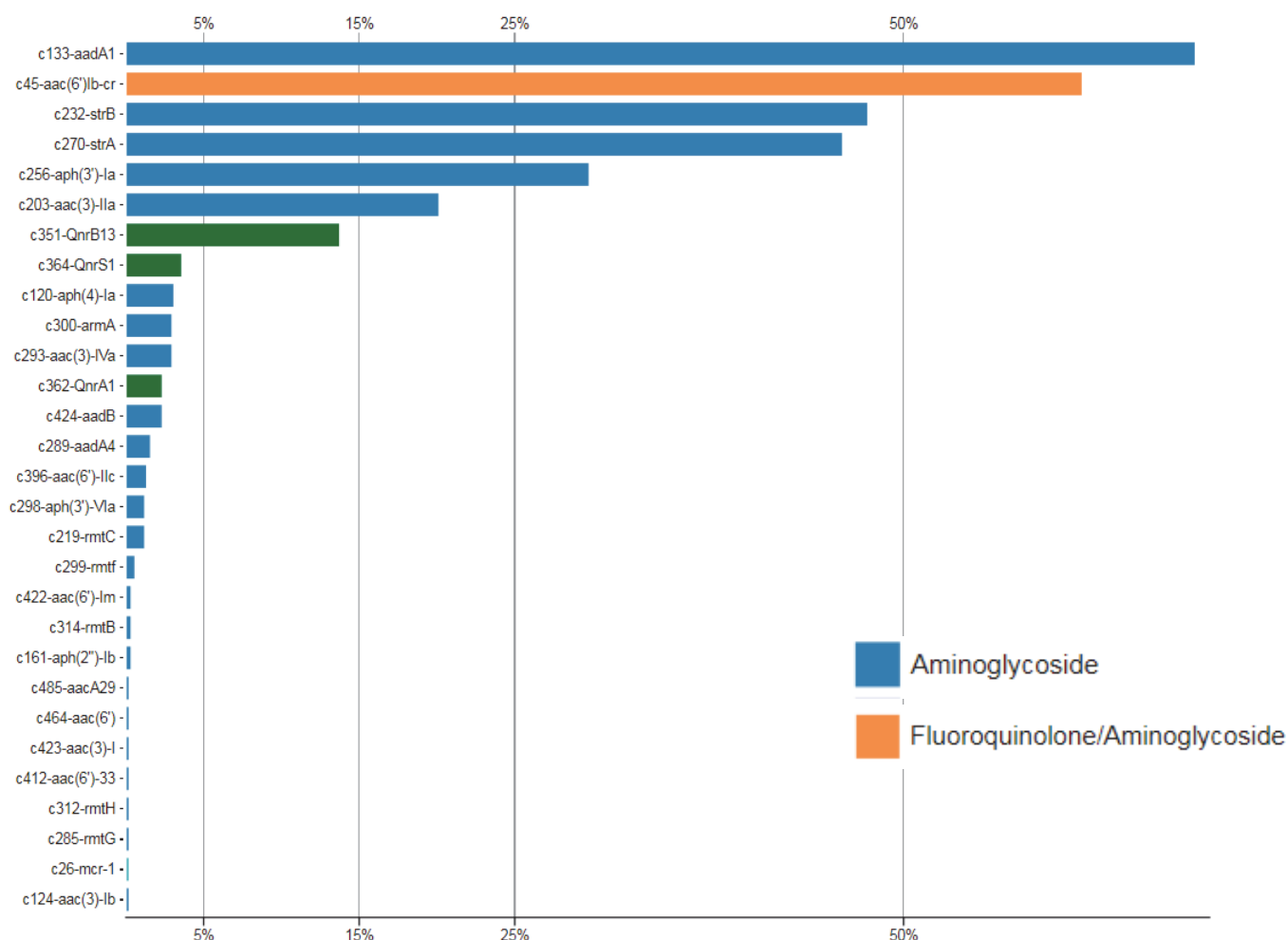


Fig. 12 : Fréquence des gènes de résistance aux aminosides et fluoroquinolones retrouvés chez *K. pneumoniae*. Tous les génomes assemblés ont été téléchargés à partir du National Center for Biotechnology Information (NCBI) en 2016 (<http://www.resistome.biosustain.dtu.dk/species.html#573>) consulté le 25/06/2021.

Les principaux mécanismes de résistance aux aminosides ont émergé entre 1940 et 1980, quand ces molécules étaient largement utilisées. La résistance aux aminosides chez les entérobactéries est principalement causée par des enzymes modifiant l'antibiotique, par acétylation, adénylation, ou phosphorylation. Il s'agit de gènes de résistance de plusieurs classes portés par des plasmides tels que les familles de gènes codant pour des acétyltransférases *aac*, des nucléotidyltransférases *ant* et des phosphotransférases *aph*. Avec la diminution de l'utilisation des aminosides en santé humaine, peu de nouveaux mécanismes de résistances ont émergé, jusqu'à la découverte de la méthylase 16S ARNr, à médiation plasmidique, appartenant à la famille de gènes *armA*. Elle empêche la fixation des aminosides à sa cible, et contrairement aux autres mécanismes, induit une résistance à tous les aminosides (16). Il existe également des gènes de résistance aux aminosides chromosomiques qui entraînent une modification de la perméabilité cellulaire par altération des pompes à efflux AcrAB-TolC et KpnEF (71,72), ou par perte de la porine KpnO (73).

D'après les données de surveillance de l'EARS-Net, le pourcentage de *K. pneumoniae* résistants aux aminosides aurait significativement diminué entre 2015 et 2018 en Europe, passant de 24.2% en 2015 à 22.7% en 2018. Ce taux est stable en France où il était de 24.8% en 2018. On observe des prévalences variables en Europe, et parallèlement aux *K. pneumoniae* résistants aux carbapénèmes, on trouve des taux plus élevés en Europe de l'Est, avec par exemple en Bulgarie un taux de 59.2% en 2018, et en Grèce où il atteint 54.4% (4).

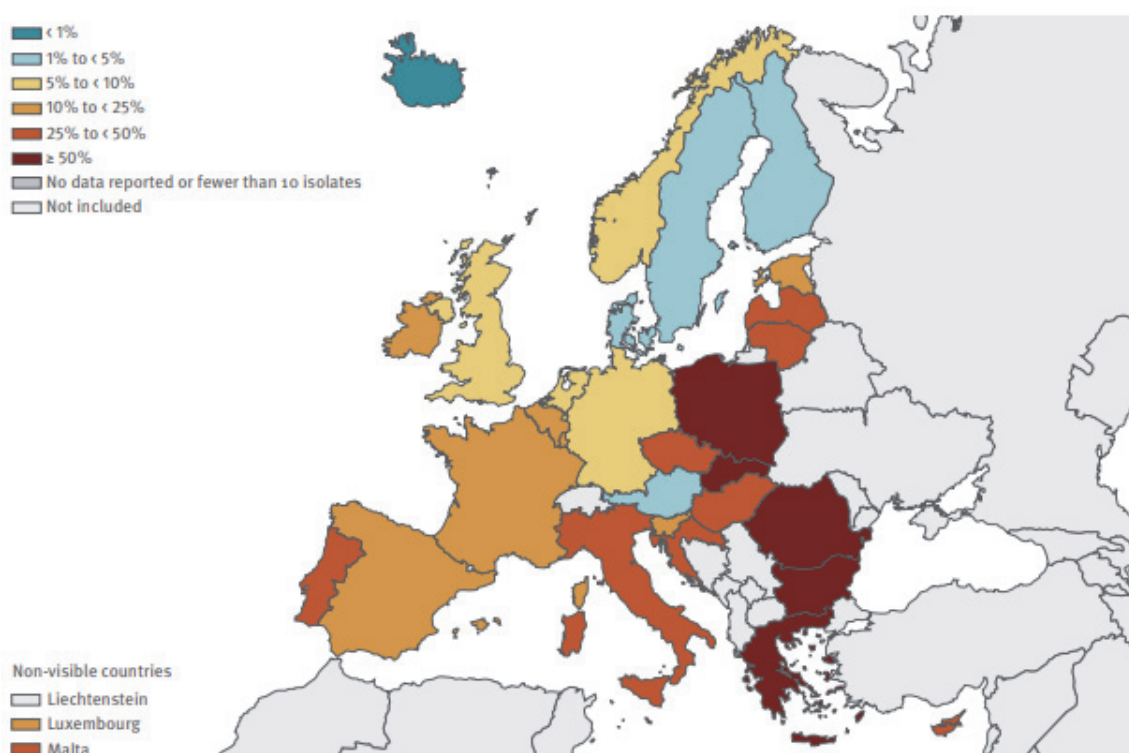


Fig. 13 : Pourcentage (%) d'isolats invasifs de *K. pneumoniae* présentant une résistance aux aminosides, par pays, pays de l'UE/EEE, 2018 (SURVEILLANCE REPORT. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018) (4)

3. Résistance à la colistine

La colistine ou polymyxine E est un peptide cationique antimicrobien appartenant à la famille des polymyxines. Elle est utilisée comme dernière ligne de traitement contre les BMR, notamment contre les ERC. Son activité est induite par un pôle cationique qui confère à la molécule une forte affinité pour les molécules chargées négativement. Elle exerce un rôle de détergent à la surface des BGN en déplaçant les cations divalents présents dans les lipopolysaccharides (LPS), principal constituant de leur membrane externe, impliquant une fuite du contenu intracellulaire (74).

La résistance acquise aux polymyxines chez les espèces naturellement sensibles est généralement le résultat d'une modification de la surface cellulaire bactérienne, notamment par modification de la structure du LPS. Il existe d'autres mécanismes de résistance qui ont été signalés, comme l'excrétion de polysaccharides capsulaires, qui piègent ou lient les polymyxines, comme on le trouve dans certains isolats de *K. pneumoniae* (75). Concernant la résistance par modification des LPS, elle se fait par addition de sucres, le 4-amino-4-déoxy-L-arabinose (L-ara4N) ou la phosphoéthanolamine sur le lipide A, fraction hydrophobe du LPS. La synthèse et la fixation de ces sucres sont respectivement gérées par un opéron de sept gènes *arnBCADTEF* et par le gène *eptA* présent chez toutes les entérobactéries. Chez *K. pneumoniae*, l'activation de cet opéron est régulée par deux systèmes à deux composants : PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ. L'activation de ces systèmes à deux composants est également modulée par d'autres régulateurs. Le gène *mgrB* codant pour la protéine MgrB, réprime l'activation de PhoPQ.

Chez *K. pneumoniae*, l'altération du gène *mgrB* chromosomique est fréquemment en cause dans la résistance à la colistine. Il provoque la perte du rétrocontrôle négatif du système PhoPQ et conduit à son activation constitutive ainsi qu'à la surexpression de l'opéron *arnBCADTEF* (76). Selon les données publiées dans la littérature, la prévalence de la mutation de ce gène parmi les mécanismes de résistance à la colistine se situerait entre 25.5 et 86.4% chez *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* (77). La résistance résultant de mutations chromosomiques, telles que les mutations impliquant les systèmes PmrA/PmrB, ou les systèmes PhoP/PhoQ n'est pas transférée horizontalement entre les bactéries.

Un gène à médiation plasmidique, *mcr-1* (*mobilized colistin resistance*), a été identifié pour la première fois en 2015 en Chine dans une souche d'*E. coli* isolée d'animaux destinés à l'alimentation et leur viande, et dans des souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* issues de patients humains en 2014 en Chine (78). Ce gène code pour une phosphoéthanolamine transférase, qui transfère la phosphoéthanolamine sur le lipide A du LPS, diminuant ainsi l'affinité de la colistine pour sa cible. Cette résistance aurait émergé chez les animaux du fait de l'utilisation massive de la colistine en médecine vétérinaire, mais a ensuite diffusée dans l'environnement et chez l'homme (79). Depuis,

d'autres gènes de résistance à la colistine contenus sur des plasmides ont émergés, (*mcr-1* à 10). Chez *K. pneumoniae*, on retrouve plus fréquemment les gènes *mcr-1*, *mcr-3* et *mcr-8* (80,81). De manière globale, la résistance à la colistine chez *K. pneumoniae* reste faible dans le monde. Cependant, l'absence de données brutes et la non-uniformisation des méthodes de détection entre laboratoires entraînent l'impossibilité de déterminer le taux exact (82). Les données de résistance à la colistine accessibles dans la littérature concernent essentiellement des souches multi-résistantes notamment aux carbapénèmes. La résistance à la colistine parmi les ERC peut se développer rapidement dans les hôpitaux et les pays où l'utilisation de la colistine est en augmentation (83–85). On observe une augmentation du taux de résistance à la colistine dans les pays où le taux d'ERC est élevé, notamment en Asie du Sud-Est, dans quelques pays d'Europe comme en Italie et en Grèce, ainsi qu'au Pakistan. En Europe, le taux de résistance à la colistine chez les souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases était de 31,9% en 2015, alors qu'il était de 2.6% chez les *K. pneumoniae* non productrices de carbapénémases données (EARS-Net). Ces données doivent être cependant interprétées avec précaution (86). En Italie, la résistance à la colistine a été identifiée chez 31,6% de souches résistantes aux carbapénèmes isolées entre 2010 et 2011 (87), et cette résistance augmente depuis : une étude italienne multicentrique réalisée sur des souches isolées entre 2013 et 2014 montre une prévalence de la résistance à la colistine parmi les *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases atteignant 44% (85). On observe le même phénomène en Grèce, avec une augmentation du taux de résistance à la colistine chez les *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes passant de 0% en 2005 à 39% en 2014 (88). Dans le reste du monde cette résistance reste relativement peu élevée.

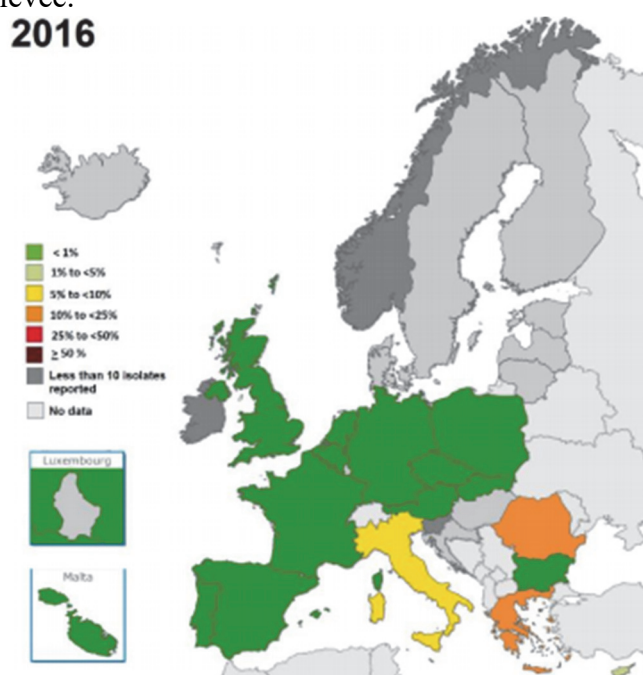


Fig. 14 : pourcentage d'isolats invasifs de *K. pneumoniae* présentant une résistance combinée aux carbapénèmes et à la colistine, UE/EEE, 2016

II. Caractérisation d'un clone bactérien : définition et méthodes

1. . Définition de clone bactérien

En biologie, on définit un clone cellulaire comme un « ensemble de cellules de même patrimoine génétique, obtenu *in vitro* par mitoses successives, à partir d'une seule cellule somatique originelle » (<http://www.culture.fr/franceterme/terme/COGB138>). Les bactéries sont des êtres unicellulaires se divisant par mitose, et tous les descendants d'une même cellule mère sont par définition des clones. Cependant, les bactéries peuvent également acquérir de l'ADN par transmission latéral de matériel génétique, par l'intermédiaire de transposons, de plasmides ou encore par recombinaison homologue (89). Cette définition stricte du clone ne peut donc être appliquée aux bactéries.

D'un point de vu épidémiologique et évolutif, la notion de clone bactérien est un terme générique utilisé pour définir plusieurs souches descendant d'un même ancêtre. La notion de clone va dépendre de la technique utilisée pour définir que deux souches sont identiques, et plus généralement du nombre de gènes comparés entre plusieurs souches. Ainsi, plus le nombre de gènes identiques est élevé, plus le patrimoine génétique commun est grand et plus les souches seront considérées comme de véritables « clones » au sens « clone cellulaire ».

2. Méthode d'identification des clones

L'identification de clones bactériens peut se faire par différentes techniques :

a. Techniques phénotypiques :

Avant l'avènement des techniques de séquençage, les relations clonales entre différentes souches bactériennes étaient réalisées en fonction de différents caractères phénotypiques. Il existe des méthodes phénotypiques basées sur les caractères :

- biochimiques (classification en biotypes ou biovars)
- antigéniques (classification en sérotypes ou sérovars)
- de sensibilité aux antibiotiques (classification en antibiotypes)
- de sensibilité aux bactériophages (classification en lysotypes ou lysovars)...

Cependant, ces techniques sont incomplètes et ne permettent pas de différencier deux clones au sens génomiques.

b. Méthodes phénotypiques moléculaires :

Electrophorèse multilocus des isoenzymes (MLEE) : différentiation des souches en comparant les profils électrophorétiques des enzymes intracellulaires.

Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) : comparaison de souches bactériennes après clivage de l'ADN bactérien par des endonucléases, puis migration par électrophorèse

Electrophorèse en champs pulsé (PFGE) : séparation des fragments d'ADN selon le même principe que la RFLP, mais faisant appel à des endonucléases qui clivent l'ADN plus fréquemment.

Amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD) : amplification par PCR de différentes parties du génome par utilisation d'amorces aléatoires, puis comparaison des différents profils en évaluant le nombre et les localisations des sites d'hybridation des amorces après migration des fragments amplifiés par électrophorèse.

Ces techniques ont été considérées pendant longtemps comme le gold standard pour déterminer la clonalité entre deux souches. Elles sont basées sur l'analyse de la diversité enzymatique ou génétique des souches, en comparant les différents profils selon les profils enzymatiques, ou en comparant le nombre et la taille des fragments d'ADN, avec ou sans amplification par PCR.

Elles sont toutefois de plus en plus abandonnées au profit des techniques de séquençage, car il est difficile de comparer les clones identifiés à l'échelle mondiale. Elles peuvent cependant être utilisées à l'échelle locale afin de mieux comprendre la pathogénicité de certains clones (90,91).

c. Techniques génomiques :

Les progrès de la technologie de séquençage des génomes ont fourni un accès sans précédent à l'énorme diversité génétique qui s'est accumulée dans le domaine bactérien au cours de 3,5 à 4 milliards d'années d'évolution. Dans un premier temps, la caractérisation de clones bactériens se faisait grâce à la réalisation de la MLST (MultiLocus Sequence Typing) par séquençage de type Sanger. Au sein d'une même espèce, la MLST permet d'identifier les souches possédant sept gènes de ménage strictement identiques, définissant ainsi le terme de complexe clonal (CC) ou séquence type (ST) (92). Cette méthode utilise les allèles comme unité de comparaison. Chaque combinaison allélique correspond à un ST. La capacité de la MLST à distinguer des espèces étroitement liées est limitée par la diversité de séquences contenues dans le génome bactérien « non couvert » par cette méthode (93).

Depuis l'avènement des techniques de séquençage à haut débit (Next Generation Sequencing, NGS), les techniques génomiques permettent désormais de séquencer des génomes entiers. Si le séquençage MLST est toujours réalisable à partir des données de NGS, il existe maintenant trois niveaux de résolutions qui permettent de discriminer les souches entre elles, sur le principe de la MLST, en utilisant les nucléotides comme unité de comparaison et permettant ainsi de fournir une meilleure résolution au sein même des complexes clonaux (92) :

- **rMLST (*ribosomal* MLST)** : comparaisons des gènes des sous-unités ribosomales : les gènes *rps*. La comparaison de ces 53 gènes permet de fournir un profil allélique rMLST, ou Séquence Type ribosomique (rST), permettant de résumer avec précision les relations entre les génomes bactériens, et d'identifier des clusters bactériens.
- **cgMLST (*core genome* MLST)** : Le core-génome représente la partie du génome présente invariablement chez une population bactérienne donnée. En effet, comme la MLST, elle permet d'analyser un grand nombre de génomes bactériens et fournit une nomenclature standard des souches facilement partageable dans un contexte international. Les schémas cgMLST contiennent généralement des centaines à des milliers de gènes, qui ne représentent qu'une partie du génome entier. Chez *K. pneumoniae*, elle permet de comparer au sein d'un groupe de souches 594 gènes. Ces méthodes sont désormais au point et ont été appliquées avec succès à l'analyse d'un certain nombre d'épidémies bactériennes (93).
- **wgMLST (*whole-genome* MLST)** : Il s'agit du niveau de résolution le plus élevé, basé sur l'analyse de tous les loci d'un isolat donné, y compris les régions intergéniques. Cependant, un défi de la wgMLST est que peu de bactéries partagent la totalité de leurs loci. Ainsi, la comparaison entre les loci partagés seulement par des sous-ensembles bactériens, et non pas tous les membres du groupe à analyser, peut présenter des difficultés statistiques. Les méthodes de cgMLST résolvent ce problème en comparant uniquement les gènes communs à l'ensemble des isolats bactériens et en fournissant des données à haute résolution sur un groupe d'isolats apparentés mais non identiques. L'approche wgMLST est applicable aux pathogènes monoclonaux à génomes rapprochés ou à des variantes très proches d'organismes, elle permet l'identification de clone avec la plus grande résolution, se rapprochant le plus du « clone cellulaire » (92–94).

L'émergence de clones épidémiques multi-résistants et/ou hypervirulents justifie une étude sensible et précise des génomes bactériens afin de mieux reconnaître et identifier les souches épidémiques. Les techniques de NGS ont fondamentalement changé l'étude des épidémies bactériennes et jouera un rôle de plus en plus central dans l'épidémiologie hospitalière à l'avenir.

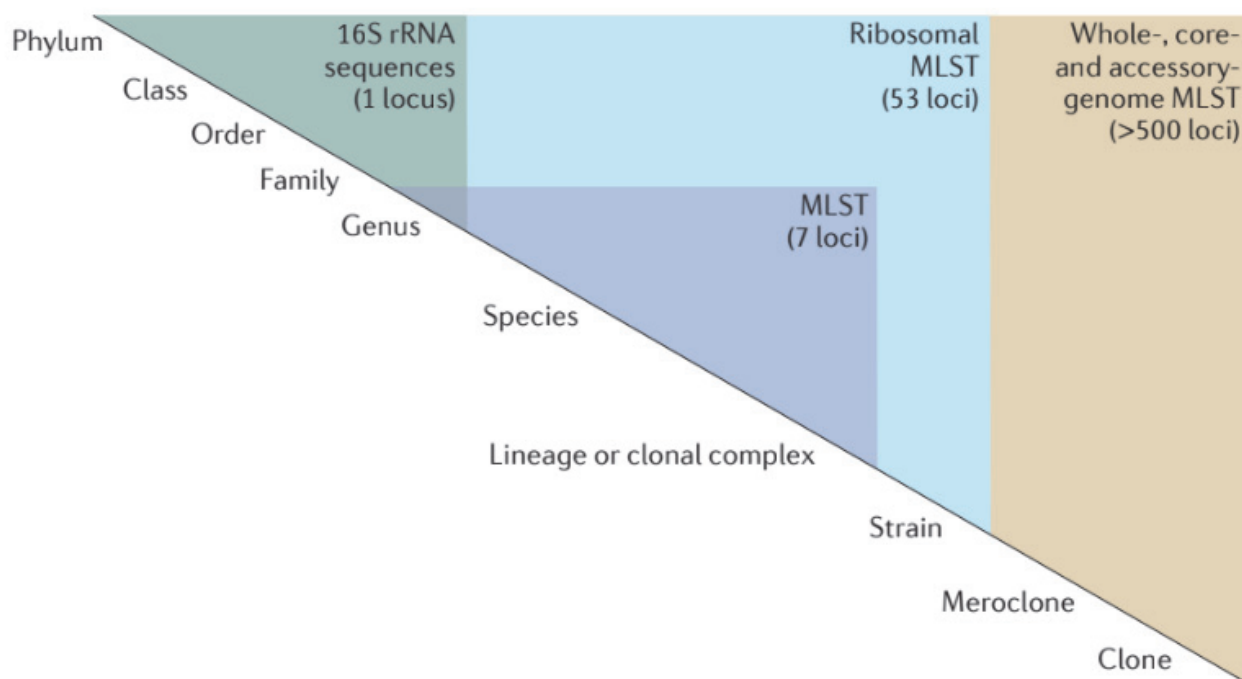


Fig. 15 : Relation entre les différentes analyses de séquences et leur nomenclature (92)

En résumé :

- Les termes « souche » et « clone » sont largement utilisés, mais leur signification peut être sujette à interprétation.
- Il n'existe pas de définition précise du degré de parenté que doivent avoir les isolats pour être considérés comme représentant la même souche, et tout dépend de la méthode de typage utilisée.
- Il est difficile de déterminer s'il faut utiliser le terme « souche » ou « clone », d'autant plus que l'usage logique du mot "clone" est de décrire des isolats qui descendent directement d'un ancêtre commun (95). Néanmoins, il a été proposé d'utiliser le mot « clone » pour décrire des « isolats qui, bien qu'ils aient été cultivés indépendamment à partir de sources différentes, dans des lieux différents et peut-être à des moments différents, présentent encore tant de similitudes phénotypiques et génotypiques identiques que l'explication la plus probable est une origine commune » (96).

III. Clones de *K. pneumoniae* multi-résistants à haut risque épidémique

C'est en 2011 que l'importance des clones bactériens à haut risque au sein de plusieurs espèces de BGN, en particulier *E. coli*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*, dans le contexte de la dissémination internationale de la résistance aux antibiotiques, a été reconnue pour la première fois. Des auteurs ont défini un "clone à haut risque" comme des isolats qui appartiennent au même ST selon le schéma de type MLST, bien que les isolats puissent avoir été isolés dans un lieu géographique et à une époque différente (95). Les CGs ou CCs sont apparus peu après et sont corrélés avec le ST (réalisé avec la méthode MLST standard).

Chez *K. pneumoniae*, même si les gènes de résistance peuvent diffuser par la transmission de transposons et de plasmides à des souches sensibles, ces dernières années, l'expansion clonale de clones épidémiques à hauts risques a pris de plus en plus d'ampleur (14,16,17). Certains clones ont ainsi disséminé dans le monde entier et dans différents écosystèmes, constituant un réservoir de gènes multi-résistants (Figure 16). Ils sont souvent associés au milieu hospitalier mais ont également été rapportés dans l'industrie agroalimentaire, ou dans l'environnement sauvage (20,97,98). Ces clones sont également associés à des résistances particulières : ainsi, le ST258 de *K. pneumoniae* est majoritairement porteurs de carbapénémases de type KPC (17).

Dans la revue bibliographique que nous avons réalisée, nous relatons l'émergence et l'expansion des clones multi-résistants internationaux de *K. pneumoniae*. Nous nous intéressons au support de la résistance associée à ces clones et aux caractéristiques qui pourraient être associées à leur succès et à leur capacité d'expansion et de persistance. Ces raisons demeurent incertaines, cependant, leur capacité à se propager rapidement est incontestable (21).

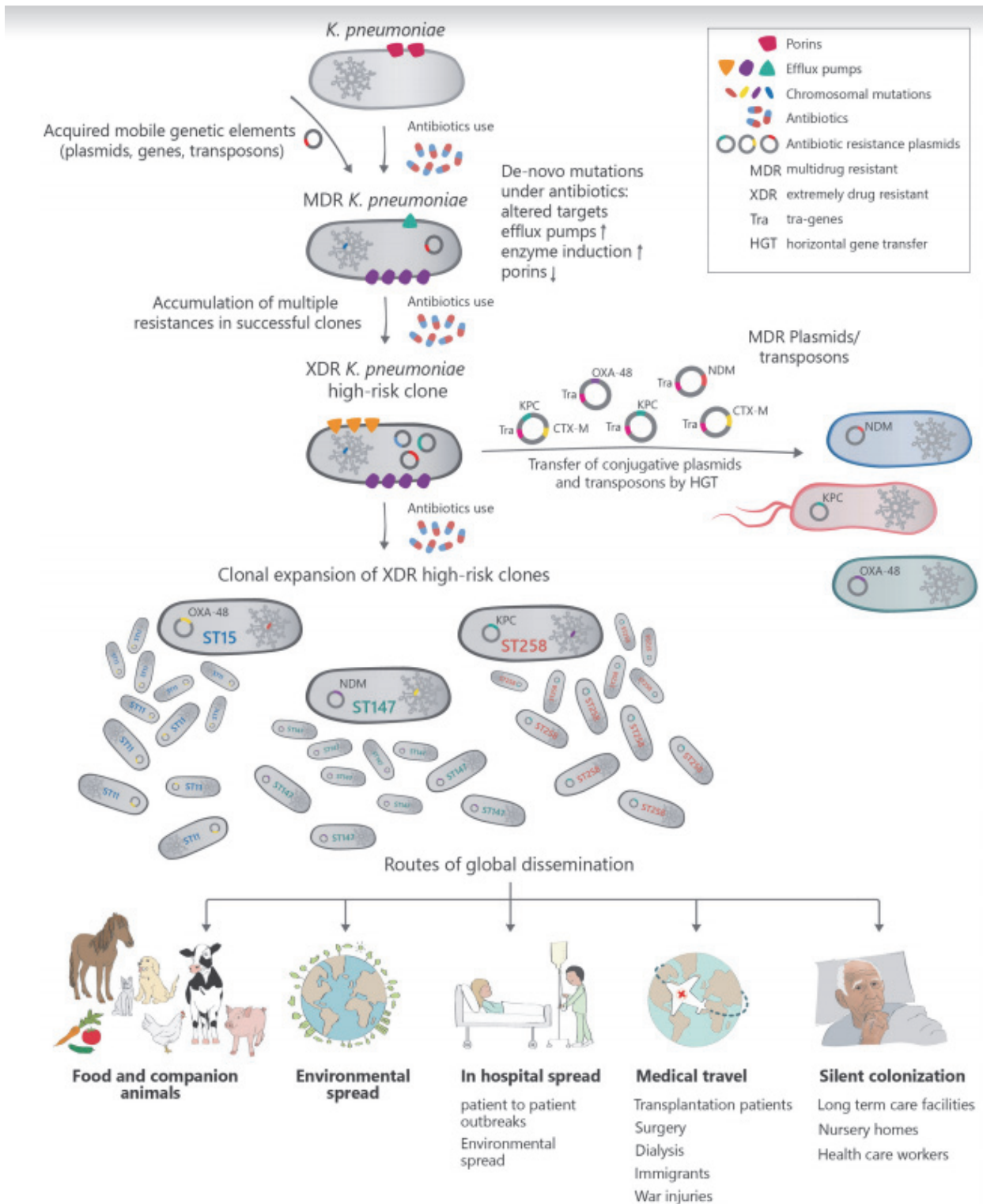


Fig. 16 : Caractéristiques de l'émergence des *K. pneumoniae* multi-résistantes et de la diffusion des gènes de résistance (16)

BIBLIOGRAPHIE

1. Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2 sept 2017;57(13):2857-76.
2. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol*. oct 2018;45:131-9.
3. Martinez JL. Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Science*. 18 juill 2008;321(5887):365-7.
4. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. 2019;
5. Christaki E, Marcou M, Tofarides A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol*. janv 2020;88(1):26-40.
6. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. sept 2010;74(3):417-33.
7. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization; 2014.
8. Wilson H, Török ME. Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Microb Genomics* [Internet]. 1 juill 2018 [cité 16 juin 2021];4(7). Disponible sur: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/mgen/10.1099/mgen.0.000197>
9. Jacob JT, Klein E, Laxminarayan R, Beldavs Z, Lynfield R, Kallen AJ, et al. Vital signs: carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013;62(9):165.
10. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. déc 2017 [cité 29 juin 2021];16(1). Disponible sur: <http://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-017-0191-3>
11. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Trecarichi EM, Tumietto F, Marchese A, et al. Predictors of Mortality in Bloodstream Infections Caused by *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*: Importance of Combination Therapy. *Clin Infect Dis*. 1 oct 2012;55(7):943-50.
12. Marques C, Menezes J, Belas A, Aboim C, Cavaco-Silva P, Trigueiro G, et al. *Klebsiella pneumoniae* causing urinary tract infections in companion animals and humans: population structure, antimicrobial resistance and virulence genes. *J Antimicrob Chemother*. 1 mars 2019;74(3):594-602.
13. Tängdén T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med*. mai 2015;277(5):501-12.

14. Potter RF, D'Souza AW, Dantas G. The rapid spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Drug Resist Updat*. nov 2016;29:30-46.
15. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 22 janv 2018 [cité 14 juin 2021];8. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00004/full>
16. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 1 mai 2017;41(3):252-75.
17. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, et al. Molecular Epidemiology of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the United States: Clonal Expansion of Multilocus Sequence Type 258. *Antimicrob Agents Chemother*. août 2009;53(8):3365-70.
18. Gomez-Simmonds A, Uhlemann A-C. Clinical Implications of Genomic Adaptation and Evolution of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Infect Dis*. 15 févr 2017;215(suppl_1):S18-27.
19. Bowers JR, Kitchel B, Driebe EM, MacCannell DR, Roe C, Lemmer D, et al. Genomic Analysis of the Emergence and Rapid Global Dissemination of the Clonal Group 258 *Klebsiella pneumoniae* Pandemic. Bengoechea JA, éditeur. *PLOS ONE*. 21 juill 2015;10(7):e0133727.
20. Loconsole D, Accogli M, De Robertis AL, Capozzi L, Bianco A, Morea A, et al. Emerging high-risk ST101 and ST307 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones from bloodstream infections in Southern Italy. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. déc 2020;19(1):24.
21. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev*. juill 2015;28(3):565-91.
22. Dunn SJ, Connor C, McNally A. The evolution and transmission of multi-drug resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: the complexity of clones and plasmids. *Curr Opin Microbiol*. oct 2019;51:51-6.
23. Babini GS, Livermore DM. Are SHV β -Lactamases Universal in *Klebsiella pneumoniae*? . *Antimicrob Agents Chemother*. août 2000;44(8):2230-2230.
24. Guo Q, Tomich AD, McElheny CL, Cooper VS, Stoesser N, Wang M, et al. Glutathione- *S* -transferase FosA6 of *Klebsiella pneumoniae* origin conferring fosfomycin resistance in ESBL-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. sept 2016;71(9):2460-5.
25. Yuan J, Xu X, Guo Q, Zhao X, Ye X, Guo Y, et al. Prevalence of the oqxAB gene complex in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*. juill 2012;67(7):1655-9.
26. Bernardini A, Cuesta T, Tomás A, Bengoechea JA, Martínez JL, Sánchez MB. The intrinsic resistome of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents*. janv 2019;53(1):29-33.
27. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net)–Annual Epidemiological Report 2019. Stockholm. 2020;

28. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*. oct 2011;17(10):1791-8.
29. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*. août 2010;300(6):371-9.
30. El-Sayed Ahmed MAE-G, Zhong L-L, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian G-B. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerg Microbes Infect*. 1 janv 2020;9(1):868-85.
31. Ambler R. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 16 mai 1980;289(1036):321-31.
32. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, et al. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol*. août 2019;431(18):3472-500.
33. Mairi A, Pantel A, Sotto A, Lavigne J-P, Touati A. OXA-48-like carbapenemases producing *Enterobacteriaceae* in different niches. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. avr 2018;37(4):587-604.
34. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2013. 2013;
35. Trystram D, Chardon H, Péan Y, Delarbre J, Costa Y, Maugat S. Réseau européen de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (EARS Net): résultats 2001-2010 pour la France et place en Europe. *BEH InVS*. 2012;42-3.
36. Chong Y, Shimoda S, Shimono N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Genet Evol*. juill 2018;61:185-8.
37. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. août 1985;28(2):302-7.
38. Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, et al. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. *J Antimicrob Chemother*. 1987;20(3):323-34.
39. Calbo E, Garau J. The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: the CTX-M-15 type consolidation. *Future Microbiol*. juin 2015;10(6):1063-75.
40. Evans BA, Amyes SGB. OXA β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. avr 2014;27(2):241-63.
41. Meyer E, Schwab F, Schroeren-Boersch B, Gastmeier P. Dramatic increase of third-generation cephalosporin-resistant *E. coli* in German intensive care units: secular trends in antibiotic drug use and bacterial resistance, 2001 to 2008. *Crit Care*. 2010;14(3):R113.

42. Moyá B, Beceiro A, Cabot G, Juan C, Zamorano L, Alberti S, et al. Pan- β -Lactam Resistance Development in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains: Molecular Mechanisms, Penicillin-Binding Protein Profiles, and Binding Affinities. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2012;56(9):4771-8.
43. Nikaido H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* déc 2003;67(4):593-656.
44. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clin Infect Dis.* 13 nov 2019;69(Supplement_7):S521-8.
45. Nordmann P. Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. *médecine/sciences.* nov 2010;26(11):950-9.
46. Peñalva G, Högberg LD, Weist K, Vlahović-Palčevski V, Heuer O, Monnet DL, et al. Decreasing and stabilising trends of antimicrobial consumption and resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in segmented regression analysis, European Union/European Economic Area, 2001 to 2018. *Eurosurveillance* [Internet]. 14 nov 2019 [cité 23 juin 2021];24(46). Disponible sur: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.46.1900656>
47. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* mai 2012;18(5):413-31.
48. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect.* sept 2014;20(9):821-30.
49. Ruppé E, Armand-Lefèvre L, Estellat C, Consigny P-H, El Mnai A, Boussadia Y, et al. High Rate of Acquisition but Short Duration of Carriage of Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae* After Travel to the Tropics. *Clin Infect Dis.* 15 août 2015;61(4):593-600.
50. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* sept 2013;13(9):785-96.
51. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 1994;38(1):71-8.
52. Haruta S, Yamaguchi H, Yamamoto ET, Eriguchi Y, Nukaga M, O'Hara K, et al. Functional Analysis of the Active Site of a Metallo- β -Lactamase Proliferating in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2000;44(9):2304-9.
53. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 avr 2001;45(4):1151-61.

54. Girmenia C, Canichella M, Serrao A. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in mediterranean countries. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 1 juin 2016;8:2016032.
55. Lee C-R, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol* [Internet]. 13 juin 2016 [cité 3 mars 2021];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00895/abstract>
56. ASSESSMENT RR. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*—second update. 2019;
57. Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis*. 15 févr 2017;215(suppl_1):S28-36.
58. Warburg G, Hidalgo-Grass C, Partridge SR, Tolmasky ME, Temper V, Moses AE, et al. A carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* epidemic clone in Jerusalem: sequence type 512 carrying a plasmid encoding aac(6')-Ib. *J Antimicrob Chemother*. 1 avr 2012;67(4):898-901.
59. Mavroidi A, Katsiari M, Likousi S, Palla E, Roussou Z, Nikolaou C, et al. Characterization of ST258 Colistin-Resistant, bla KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek Hospital. *Microb Drug Resist*. juill 2016;22(5):392-8.
60. Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, et al. An update of the evolving epidemic of bla_{KPC-2}-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother*. 1 juill 2011;66(7):1510-3.
61. Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Adembri C, Dell'utri P, Santagati M, et al. Emergence of an extensively drug-resistant ArmA- and KPC-2-producing ST101 *Klebsiella pneumoniae* clone in Italy. *J Antimicrob Chemother*. 1 août 2013;68(8):1932-4.
62. Markovska R, Stoeva T, Schneider I, Boyanova L, Popova V, Dacheva D, et al. Clonal dissemination of multilocus sequence type ST15 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. *APMIS*. oct 2015;123(10):887-94.
63. Hu L, Zhong Q, Tu J, Xu Y, Qin Z, Parsons C, et al. Emergence of bla_{NDM-1} among *Klebsiella pneumoniae* ST15 and novel ST1031 clinical isolates in China. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1 avr 2013;75(4):373-6.
64. Davis B, Lilly HA, Lowbury EJJ. Gram-negative bacilli in burns. *J Clin Pathol*. 1 nov 1969;22(6):634-41.
65. Rydberg J, Larsson C, Miörner H. Resistance to Fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Scand J Infect Dis*. janv 1994;26(3):317-20.
66. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. Tolmasky M, Alonso JC, éditeurs. *Microbiol Spectr* [Internet]. 19 sept 2014 [cité 21 juin 2021];2(5). Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013>

67. Ruiz E, Sáenz Y, Zarazaga M, Rocha-Gracia R, Martínez-Martínez L, Arlet G, et al. qnr, aac(6')-Ib-cr and qepA genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.*: genetic environments and plasmid and chromosomal location. J Antimicrob Chemother. avr 2012;67(4):886-97.
68. Bado I, Gutiérrez C, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Araújo Pirez L, Seija V, et al. CTX-M-15 in combination with aac(6')-Ib-cr is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, including *K. pneumoniae* ST258, in an ICU in Uruguay. J Glob Antimicrob Resist. sept 2016;6:5-9.
69. Tolentino FM, Bueno MFC, Francisco GR, Barcelos DD de P, Lobo SM, Tomaz FMMB, et al. Endemicity of the High-Risk Clone *Klebsiella pneumoniae* ST340 Coproducing QnrB, CTX-M-15, and KPC-2 in a Brazilian Hospital. Microb Drug Resist. mai 2019;25(4):528-37.
70. Garcia-Fulgueiras V, Araujo L, Bado I, Cordeiro NF, Mota MI, Laguna G, et al. Allodemic distribution of plasmids co-harboring *bla_{CTX-M-15}* / *aac(6')-Ib-cr* / *qnrB* in *Klebsiella pneumoniae* is the main source of extended-spectrum β -lactamases in Uruguay's paediatric hospital. J Glob Antimicrob Resist. juin 2017;9:68-73.
71. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence. Antimicrob Agents Chemother. janv 2010;54(1):177-83.
72. Srinivasan VB, Rajamohan G. KpnEF, a New Member of the *Klebsiella pneumoniae* Cell Envelope Stress Response Regulon, Is an SMR-Type Efflux Pump Involved in Broad-Spectrum Antimicrobial Resistance. Antimicrob Agents Chemother. sept 2013;57(9):4449-62.
73. Srinivasan VB, Venkataramaiah M, Mondal A, Vaidyanathan V, Govil T, Rajamohan G. Functional Characterization of a Novel Outer Membrane Porin KpnO, Regulated by PhoBR Two-Component System in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. Freitag NE, éditeur. PLoS ONE. 25 juill 2012;7(7):e41505.
74. Falagas ME, Kasiakou SK, Saravolatz LD. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. Clin Infect Dis. 1 mai 2005;40(9):1333-41.
75. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front Microbiol [Internet]. 26 nov 2014 [cité 20 juin 2021];5. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00643/abstract>
76. Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. Curr Med Res Opin. 3 avr 2015;31(4):707-21.
77. Baron S, Hadjadj L, Rolain J-M, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. Int J Antimicrob Agents. déc 2016;48(6):583-91.
78. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. févr 2016;16(2):161-8.

79. Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Eurosurveillance* [Internet]. 3 mars 2016 [cité 20 juin 2021];21(9). Disponible sur: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155>
80. Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *J Antimicrob Chemother*. 1 nov 2020;75(11):3087-95.
81. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes Infect*. 1 janv 2020;9(1):508-16.
82. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC Variability by Method for Contemporary Clinical Isolates of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol*. juin 2013;51(6):1678-84.
83. Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Petrolito V, Sciortino D, Sciacca A, et al. Outbreak of KPC-3-producing, and colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* infections in two Sicilian hospitals. *Clin Microbiol Infect*. sept 2011;17(9):1444-7.
84. Parisi SG, Bartolini A, Santacatterina E, Castellani E, Ghirardo R, Berto A, et al. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* strains producing carbapenemases and increase of resistance to colistin in an Italian teaching hospital from January 2012 To December 2014. *BMC Infect Dis* [Internet]. déc 2015 [cité 17 juin 2021];15(1). Disponible sur: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-015-0996-7>
85. Monaco M, Giani T, Raffone M, Arena F, Garcia-Fernandez A, Pollini S, et al. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. *Eurosurveillance* [Internet]. 23 oct 2014 [cité 17 juin 2021];19(42). Disponible sur: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.42.20939>
86. ECDC. Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). 2017;
87. Capone A, Giannella M, Fortini D, Giordano A, Meledandri M, Ballardini M, et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *Clin Microbiol Infect*. janv 2013;19(1):E23-30.
88. Spyropoulou A, Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Vamvakopoulou S, Marangos M, Spiliopoulou I, et al. A ten-year surveillance study of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care Greek university hospital: predominance of KPC- over VIM- or NDM-producing isolates. *J Med Microbiol*. 1 mars 2016;65(3):240-6.
89. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. oct 2018 [cité 24 juin 2021];31(4). Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00088-17>
90. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournibize R, Diancourt L, et al. Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. *PLoS ONE* [Internet]. 25 mars 2009 [cité 15 mai 2020];4(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2656620/>

91. Liu C, Du P, Zhao J, Li B, Wang C, Sun L, et al. Phenotypic and Genomic Characterization of Virulence Heterogeneity in Multidrug-Resistant ST11 *Klebsiella pneumoniae* During Inter-Host Transmission and Evolution. *Infect Drug Resist.* juin 2020;Volume 13:1713-21.
92. Maiden MCJ, van Rensburg MJJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol.* oct 2013;11(10):728-36.
93. Dekker JP, Frank KM. Commentary: Next-Generation Epidemiology: Using Real-Time Core Genome Multilocus Sequence Typing To Support Infection Control Policy. Bourbeau P, éditeur. *J Clin Microbiol.* déc 2016;54(12):2850-3.
94. Maiden MCJ. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* oct 2006;60(1):561-88.
95. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* sept 2011;35(5):736-55.
96. Orskov F, Orskov I. Summary of a Workshop on the Clone Concept in the Epidemiology, Taxonomy, and Evolution of the Enterobacteriaceae and other Bacteria. *J Infect Dis.* 1 août 1983;148(2):346-57.
97. Jelić M, Hrenović J, Dekić S, Goić-Barišić I, Tambić Andrašević A. First evidence of KPC-producing ST258 *Klebsiella pneumoniae* in river water. *J Hosp Infect.* oct 2019;103(2):147-50.
98. Chaalal N, Touati A, Bakour S, Aissa MA, Sotto A, Lavigne J-P, et al. Spread of OXA-48 and NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST48 and ST101 in Chicken Meat in Western Algeria. *Microb Drug Resist.* 1 avr 2021;27(4):492-500.

Title: Antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* clone

Running title:

Authors list: Alizee Balandraud, Linda Hadjadj, Jean-Marc Rolain and Sophie Alexandra Baron.

Affiliations: ¹ Aix Marseille Univ, IRD, APMH, MEPHI, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 19-21 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille CEDEX 05, France.

² IHU Méditerranée Infection, 19-21 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille CEDEX 05, France

* **Corresponding author:** Sophie Alexandra Baron, Aix Marseille Univ, IRD, APMH, MEPHI, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 19-21 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille CEDEX 05, France. Phone: (33) 4 13 73 24 01. Email: sophie.baron@ap-hm.fr

Summary: 181

Text: 4480

Reference: 136

Figures: 2

Tables: 1

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Multidrug resistance, clonal complexes

Abstract (181 words)

Klebsiella pneumoniae is an opportunistic, frequently multidrug-resistant (MDR) bacterial pathogen that affects humans, often causing severe infections worldwide, and is associated with high mortality in hospitalized patients. Over the past two decades, numerous studies have reported an increase in the rate of resistance to certain antibiotics, including third-generation cephalosporins (3GC) and carbapenems. Some clonal complexes (CC) characterized by their multi-resistance have been identified as the cause of hospital epidemics on all continents, which constitutes a real threat to public health.

The objective of this review is to report the emergence and expansion of these high-risk *K. pneumoniae* clones, and to discern their specific characteristics, such as the resistance genes with which they are most often associated, as well as the virulence factors that may be added to them. Here, we are particularly interested in seven clonal complexes (CC258, CC147, CC307, CC101, CC15, CC37, CC20) that have spread worldwide for the most part, and have been found in human, environmental and animal samples. Additional studies are needed to better understand the circulation of these clones and their ability to acquire resistance genes.

Introduction

The *Klebsiella pneumoniae* complex currently consists of seven members, namely *Klebsiella pneumoniae* stricto sensu (Kp1), *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (Kp2), *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (Kp4), *Klebsiella variicola* subsp. *variicola* (Kp3), *Klebsiella variicola* subsp. *tropica* (Kp5), *Klebsiella quasivariicola* (Kp6) and *Klebsiella africana* (Kp7), the latest of which was described in 2019 [1]. From these species, their ecological niches, pathogenicity, and acquisition of antibiotic resistance genes are not yet fully understood, as they have long been misidentified [2].

Antibiotic resistance is a current public health problem that affects human, animal and environmental health and is linked to the massive and uncontrolled use of antibiotics in these different ecosystems [3]. The emergence of multidrug-resistant bacteria (MDR) and the spread of antibiotic resistance genes is not, however, only linked to the widespread use of antibiotics [4]. It is also facilitated by the ability of pathogens to exchange genetic elements of resistance and virulence. Horizontal gene transfer (HGT) is mostly mediated by plasmids, which play a key role in the spread of resistance between bacterial strains, and MDR strains may accumulate multiple resistance plasmids in their cytoplasm [5]. However, the dissemination of resistance genes can also result from the expansion of multi-resistant clones [6]. In recent years, a real increase in resistance to certain classes of antibiotics such as carbapenems has been observed in *K. pneumoniae* (Figure 1) [7]. This enteric bacteria presents certain characteristics such as the plasticity of its genome, its capacity to cause severe community infections and to persist in the environment which can explain the success of the emergence and the diffusion of multi-resistant strains [8].

The *K. pneumoniae* species consists of various clones that differ in terms of ecological niche, host source, pathogenicity, and the capacity to acquire antibiotic resistance genes or virulence genes [1]. Although *K. pneumoniae* stricto sensu is the most commonly found species

associated with human infections, all species have been isolated from human samples. After *K. pneumoniae*, *K. variicola* and *K. quasipneumoniae* are the most frequent species found [2,9,10]. These two species can acquire antibiotic resistance genes and virulence genes from *K. pneumoniae* and have been responsible for nosocomial infections and primary liver abscesses [9,10]. Within the *K. pneumoniae* species, isolates are conventionally characterised according to their sequence type (ST), defined by a nucleotide sequence-based method known as Multi-Locus Sequence Typing (MLST) [11]. In short, every isolate of the same ST has the same combination of allelic profiles of seven housekeeping genes (*rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* and *tonB*). There are currently 5,587 different STs (last updated 1 June 2021) that have been deposited on the Pasteur website (<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella>) and this number is constantly increasing. With the more widespread use of whole-genome sequencing (WGS), the databases have been enriched and isolates are increasingly differentiated by the comparison of their ribosomal genes (rMLST) or their core genome (cgMLST) [12,13]. High levels of discrimination among closely-related clones is obtained with rMLST, comparing the variation of 53 ribosomal protein subunit (*rps*) genes across the bacterial domain [14]. ST profiles are grouped into clonal complexes or clonal groups (CC or CG) defined by cgMLST (Figure 1), corresponding to isolates that share at least 594 cgMLST alleles (of the 694 alleles), with at least one member of the clonal group [13]. An even higher level of resolution exists, known as wgMLST, which compares the entire genome of isolates. However, very few bacteria share the same loci due to bacterial plasticity (horizontal and vertical transfer of genetic material), and as a result, wgMLST is only used to compare closely related organisms during epidemics within the same structure, for example [14].

CGs are correlated with STs (performed with the standard MLST method), which remains a reference to study genetic relationships between isolates worldwide [1]. However, cgMLST makes it possible to understand the relationship between these STs. For instance, the

international multi-drug resistant clone ST258 is part of the CG258, which also includes ST512 and ST11 (Figure 2) [13]. Although most clones have already been isolated in human samples, some clonal complexes are more frequently found in human diseases and have been associated with higher virulence or antibiotic resistance and a greater ability to spread locally and globally [1]. In this review, we will focus on the major international multi-drug resistant (MDR) *K. pneumoniae* clonal complexes that are of current concern to the scientific community. We will recall the history of the emergence of these strains and antibiotic resistances, sources, and other particularities with which they are associated.

CG258

Most MDR *K. pneumoniae* isolates belong to one CG designated as CG258 [13]. Within CG258, ST258 and ST512 isolates form a large cluster, whereas ST11 and ST340 differ from this cluster by 11.0% allelic mismatches, indicating a genetic substructure within this CG. The ST258 clone is the dominant ST in CG258 [13] that was first described in 2009, during an epidemiological analysis of *K. pneumoniae*-carbapenemase-(KPC)-producing *K. pneumoniae* strains isolated from different parts of the United-States, Israel and India between 1996 and 2008. This KPC carbapenemase was first described in 1996 in a non-ST258 isolate of *K. pneumoniae* in the United States [15]. Shortly after that, a report described numerous strains of KPC-producing *K. pneumoniae* in New York city hospitals between 1997 and 2001[16]. It was only in 2009, during a retrospective molecular epidemiological study, that the ST258 clone was identified by PFGE and MLST. Thus, ST258 strains would have emerged in clinical outbreaks in New York in April 2000, and these strains were genetically related to strains isolated in the Israel outbreak in 2006 [17,18]. KPC-producing ST258 was also identified in isolates from Norway and Sweden obtained from patients who had previously been hospitalised in Greece and Israel, suggesting the possible spread of these strains [19]. In 2009, the ST258 clone was predominant in the United States, and was responsible for 70% of the *bla*_{KPC} producing *K.*

pneumoniae isolates obtained from different parts of the country. In Israel, the incidence of KPC-producing *K. pneumoniae* decreased, but ST258 remains the most predominant clone [20]. Bayesian analysis estimates the most recent common ancestor of the global ST258 group to date to around 1995 (95% highest posterior density [HPD] 12.3 to 23.1 years), that to say five years before the first outbreaks of ST258 clones. A report analysing ST258 genomes isolated from more than 20 countries showed that ST258 isolates from the United States were basal in the phylogenetic tree, supporting the hypothesis that *K. pneumoniae* ST258 emerged in the United States. This was succeeded by the introduction of ST258 clones in Greece, before it spread throughout Europe (especially Italy), North and South America and, with a lower prevalence, Asia and Australia [21]. ST258 clones have been described as a cause of prolonged outbreaks in Intensive Care Units (ICU) [22]. It appears to be highly associated with human-host and hospital environments, and has rarely been isolated in animals, but has been identified as the cause of bovine mastitis, and was isolated from river water for the first time in 2019 [23–26]. Comparative genomic analyses suggest that the ST258 clone is a hybrid of ST11 (~80% of genomic DNA) and ST442-like strains (~20% of genomic DNA) [27]. Meanwhile, ST258 strains can be divided into two ST258 clades, with distinct capsule polysaccharide gene (*cps*) regions [28]. ST258 clade I strains carry the *cps-I* gene cluster characterised by the *wzi29* allele variant. They would have evolved from clade II strains which carry the *cps-2* gene cluster characterised by the *wzi154* allele variant through homologous recombination of the *cps* region. Clade I is associated with KPC-2, while clade II is associated with KPC-3. To date, only one isolate of *K. pneumoniae* ST258 has been reported to carry hypervirulent-associated siderophores [29]. However, it has been demonstrated that the acquisition of single hypercapsule-conferring mutations among ST258 strains resulted in virulence phenotypes such as dissemination and increased lethality, and that these mutants were undergoing selection which could explain the high mortality and rapid spread reported for carbapenem-resistant *K.*

pneumoniae (CRKP)[30]. As described above, the ST258 clone has been widely associated with KPC-producing *K. pneumoniae* and the transmission of colistin-resistant ST258-KPC isolates have been documented among ICU patients [31]. Resistance to the association of ceftazidime and avibactam has also been described in a ST258 clone harbouring a *bla*_{KPC-23} gene in Greece [32]. Unlike ST258, other CG258 strains are associated with a variety of carbapenemases such as KPC, NDM, VIM, and OXA-48 [33].

The ST11 clone was first reported in France in 1997 and has now spread worldwide, with a predominance in Asia [34]. It has also been sporadically described in Latin America, Europe, the United States, the Middle East and North Africa [35]. ST11 is a single locus variant of ST258 which indicates a close relationship between them. In China, ST11 CRKP is the dominant clone and accounts for up to 60% of CRKP [35,36]. It has been shown that the integrative and conjugative element ICEKp258.1, which is harboured by both ST11 and ST258 clones, carries a type IV secretion system, which could potentially promote the transfer of genetic elements such as plasmids and explain the success of epidemics of these clones [37]. Most infections caused by ST11 clones appear in ICUs and are associated with nosocomial infections [38]. The pan-genomic analysis of 364 ST11 *K. pneumoniae* isolated from 13 different countries identified three clades of ST11. There are 15 different K-types that have been identified among ST11 clones. The most common ones are KL64 and KL47. Clade 1 contains the most diverse K types, clade 2 contains only KL47 and clade 3 contains mainly KL64 [39]. Among the ST11 clones, a variety of carbapenemases and extended-spectrum β -lactamase (ESBL) genes have been identified, but the most predominant ones are *bla*_{KPC-2}, *bla*_{NDM-1} and *bla*_{OXA-48} for carbapenemases and *bla*_{CTX-M-65}, *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{CTX-M-14} for ESBL [40]. Co-resistance to 3GC and fluoroquinolone have been reported in this clone [41,42]. ST11 may also harbour resistance genes against other antibiotics, including ceftazidime/avibactam and colistin [40,43]. ST11 *K. pneumoniae* strains are therefore not only highly resistant to

antibiotics. Some isolates were described for the first time in 2018 to have acquired well established virulence factors (*rmpA2* and aerobactin) in South-East Asia, which raises concerns about the possible occurrence of infections with high mortality and limited treatment options[36]. The genomic analysis of clinically important ST11 *K. pneumoniae* suggests that K-type KL64 ST11 CRKP strains carry more resistance and virulence genes, thus becoming a newly-emerged superbug [39]. Furthermore, in 2018, following the identification of homologous regions between a non-conjugative virulence plasmid and a conjugative plasmid carrying the *bla_{KPC-2}* resistance gene, it was suggested that transmission of the *K. pneumoniae* ST23 virulence plasmid to the ST11 CRKP is mediated by the co-integrated transfer of these two plasmids. [44]. Carbapenemase-producing ST11 *K. pneumoniae* have also been previously identified in pets and hospital environments [45,46].

The ST340 clone was first described in Oman in 2010, harbouring a *bla_{NDM-1}* gene [47], and is now widely associated with this gene. However this multidrug-resistant clone can be associated with other antibiotic resistance genes, such as *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{SHV-12}* and *bla_{TEM-1}* [48], can harbor *qnrB* genes [49] and has been reported to be colistin-resistant in one study [50]. This clone is the most dominant of CRKP isolates in Thailand, and has been sporadically reported in Russia [51]. It has been shown that, when associated with the *bla_{KPC-2}* gene, the plasmid was carrying the *Tn4401b* isoform of the *Tn4401* transposon, which has no deletion upstream of *bla_{KPC-2}*, affecting the production of *bla_{KPC-2}*. Therefore, the ST340 strains reveal lower resistance levels to β -lactams as compared to those derived from the isolates of other STs containing the *Tn4401a* isoform [52]. ST340 has been isolated in pets, domestic animals and hospital environments, which could lead to a potential spread of this clone [53–55].

The ST512 clone emerged in 2006–2007 after a single mutation of ST258 in an outbreak in Israel and became a successful new lineage. It differs from the ST258 clone by a C176A transversion in the *gapA* locus [56,57]. ST512 is invariably associated with the *cps-2* capsular

type, suggesting that ST258 *wzi154* could be the ancestor of ST512 [58]. This clone is associated with *bla_{KPC-3}* resistance and can be associated with other antimicrobial resistance genes. In Italy, GC258 *K. pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases have been highly represented in the epidemic of CRKP which has been ongoing since 2010, the majority being ST512 clones [59]. ST512 is mostly a cause of human infections, but has been isolated in wild animals [60].

CG147

The first data in the literature concerning *K. pneumoniae* ST147 date to 2008 in Hungary, in 46 strains that had been isolated in 2005 [42,61]. These strains were harbouring the *bla_{CTX-M-15}* gene, *gyrA* S83I and *parC* quinolone resistance determining regions (QRDR) mutations. As described above for ST11 isolates, the dissemination of CTX-M-15 is mostly associated with ciprofloxacin-resistant bacterial strains [42]. *K. pneumoniae* ST147 has now been isolated worldwide, and associated with *bla_{VIMs}*, *bla_{KPC-2}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{OXA-48}* and *bla_{OXA-181}* [62]. ST147 is the most common clone among VIM-producing *K. pneumoniae*, and the second most common, behind CG258 clones, among KPC-producing *K. pneumoniae*, as shown in global collection surveillance data [52,63]. Moreover, KPC-2 producing CRKP ST147 can also transfer ceftazidime-avibactam resistance through the acquisition of a Vietnamese extended-spectrum β -lactamase variant (VEB-25), as demonstrated during an outbreak in two ICUs in Greece [64]. Some isolates have also been described as pan-drug resistant, including colistin-resistant [65,66]. Nevertheless, ST147 is predominantly associated with the production of CTX-M-15. An investigation of the CRISPR regions showed that all ST147 shared the same CRISPR contents in region 1, while the other regions showed differences among ST147 [67], and it was recently shown for *Clostridium difficile* that the analysis of CRISPR loci is a useful epidemiological tool for studying the diversity of the genomes of closely related strains [68]. Infections caused by the ST147 clone are mainly healthcare-related, but sometimes associated

with a recent travel to endemic regions [47,63]. The ST147 clone is often responsible for hospital outbreaks in many parts of the world [69–73], [69–73], and can rectally colonise patients and/or cause urinary tract infections, bloodstream infections and respiratory tract infections with mortality of up to 50% [71,72]. The ST147 clone has been isolated in samples other than human samples, such as wastewater, pets and food production animals, which suggests that this clone is spreading in the environment, and could be a key vehicle for the transfer of resistance genes between animals and humans [74–76].

CG307

The ST307 clone was first described in 2013 from one strain isolated in 2009 in Pakistan and another isolated in 2010 in Texas [77,78]. However, the oldest strain dates back to 2008 in the Netherlands. (<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). Since then, the emergence and worldwide spread of this clone have been reported in numerous studies describing the ST307 clone in all five continents and in many countries in the past decade [62,79–82]. Reports have shown that this clone appeared in the 1990s at about the same time as CC258, probably in the United States, before spreading globally [79]. However, the ST307 clone was reported and recognised as a globally disseminated clone a decade after the ST258 clone. The phylogeny of ST307 shows that four deep-branching lineages exist, one of them spreading globally, the second being only located in Texas [79]. The two other clades first emerged around 2013 in South Africa and then evolved in two distinct clades that are now the most prevalent clones in South Africa, where a recent study reported that 61% of the CRKP belonged to the ST307 [80]. The “global” clade of ST307 has spread in recent years to become one of the most important AMR high-risk clones around the world, including in Italy where it progressively replaced CG258 [81,83]. This clone has been strongly associated with the hospital environment and human hosts [81]. ST307 strains have also been isolated from animal and environmental samples. Recently, strains belonging to ST147 and ST307 were isolated from chimpanzee

faecal samples and termite mounds from a reserve in Senegal, where wildlife have very limited contact with human activities (Baron *et al.*, unpublished data), suggesting a more global spread of these clones, and expanding their potential reservoirs. Regarding AMR determinants, *K. pneumoniae* ST307 is associated with ESBLs and carbapenemases: CTX-M-15, KPC-2 and -3, OXA-48, NDM-1, OXA-181, and VIM-1 [62,84,85]. Colistin resistance not mediated by *mcr* genes [86,87] and resistance to ceftazidime-avibactam has also been described in this clone due to the emergence of a KPC-3 variant [88]. All ST307 clones share the same K and O antigen loci (KL102), and WGS of the capsular loci of ST307 clones identified two different capsular loci: the *wzi-173* allele, and another cluster encoding for a different capsular type (Cp2). This cluster has similar sequences with capsular clusters previously identified in *K. quasipneumoniae* and *Klebsiella aerogenes* and has never been described in other *K. pneumoniae*. It has been shown that capsulated ST307 isolates endowed with the two clusters were more resistant to serum complement than ST258 isolates [81]. Analysis of a ST307 hospital outbreak in Germany through a pangenomic study and phenotypic tests demonstrated the capacities of these isolates (hypermucoviscosity, siderophore secretion capacities, heavy metal efflux) which were similar to an archetypal hypervirulent *K. pneumoniae*. Some virulence and antibiotic resistance genes are co-located on plasmids *K. pneumoniae* ST307 and could be responsible for increased fitness, persistence and adaptation to the hospital environment and the human host [89]. Numerous studies suggest that the association of hypervirulence and multidrug resistance on plasmids may facilitate the successful spread of these bacteria [81,85,90,91].

CG15

CG15 is known to be hypervirulent and responsible for serious illnesses. ST15 *K. pneumoniae* is the main clone of CG15 and has been identified worldwide [92–94]. It is the major group among the strains producing the *bla*_{CTX-M-15} gene in many countries, especially in Asia [95]. The

association of ST15 *K. pneumoniae* and resistance to all fluoroquinolones has been highlighted several times [42,45]. *bla*_{NDM-1}-positive *K. pneumoniae* ST15 isolates have frequently been reported in many countries in Europe and North Africa, as well as in China, Thailand and Canada [92]. In Bulgaria, this clone initiated a dissemination of KPC-2 producing-*K. pneumoniae* [96]. Moreover, some studies show that *K. pneumoniae* ST15-CTX-M-15 producers are widely disseminated among pets, causing several infections. ST15 *K. pneumoniae* has also been isolated from environmental samples [97,98].

CG37

The earliest ST37 strain was a KPC-producing *K. pneumoniae* and was identified in North Carolina in 1996 [18]. ST37 *K. pneumoniae* have been detected sporadically in many parts of the world, but mainly in Europe, China and India [99,100]. They are associated with MDR *K. pneumoniae* such as ESBL, AmpC or carbapenemase producers [101]. ST37 *K. pneumoniae* seems to be a newly emerging clone, and a DHA-1-producing-ST37 clone has caused an outbreak in Spain, harbouring carbapenem and colistin resistance [102]. ST37 clones were responsible for an outbreak in Chinese neonates, harbouring *bla*_{NDM-1} [100], and have also been isolated harbouring the *bla*_{OXA-1} gene in neonates in China [103]. ST37 clones have also been identified sporadically harbouring *bla*_{KPC-2} in China, Croatia and Italy [104–106]. MDR IncR plasmids appear to have disseminated in ST37 clones, and captured the *armA*-*bla*_{DHA-1}-*qnrB* resistance gene cluster, since it has been identified in strains isolated in the United States and in Spain, and that plasmids from both countries were genetically close [101,102]. A study also showed the faecal carriage of ST37 *K. pneumoniae* in healthy individuals. This digestive colonisation could become a reservoir for possible infections [107]. Moreover, ST37 *K. pneumoniae* was isolated in pets, was harbouring 16S rRNA methyltransferase (16S-RMTase) genes, and possessed high-level resistance to amikacin and gentamicin [108].

CG101

ST101 *K. pneumoniae*, belonging to the CC101, were originally identified in 2009 in Rio de Janeiro [109], before being responsible for outbreaks and sporadic cases in Mediterranean countries such as Italy and Tunisia. It is now considered as a newly emerging phenotype in several countries [110]. These ST101 clones mostly harbour *bla*_{KPC-2}, *bla*_{KPC-3} and *bla*_{OXA-48} genes, conferring resistance to carbapenems, but are always associated with genes conferring resistance to aminoglycosides and fluoroquinolone [83,111]. ST101 clones can harbour many types of ESBL genes, but the most frequent are CTX-M-15-producing-*K. pneumoniae* [112]. Colistin resistance has also been observed in *bla*_{OXA-48} and *bla*_{KPC-2} ST101 *K. pneumoniae* [112,113]. These isolates are mainly associated with hospital-acquired infections. Some studies have shown that ST101 clones are associated with an increased mortality in comparison with non-ST101 clones [112]. The siderophore genes *irp1* and *irp2* and the integrative conjugative element ICE*Kp3* mobilizing the *ybt* locus (locus encoding the siderophore yersinobactin and its receptor) are found in lineage ST101. These are known virulence factors, and ICE*Kp* increases the ability of the ST101 clone to spread. [112]. Such characteristics of this clone make it a major threat to public health, as it could become a dual-risk epidemic clone: multi-drug resistant and hypervirulent.. A recent study showed the spread of the NDM-1-producing-ST101 clone in chicken meat in North Africa, demonstrating that food could be a reservoir of carbapenemase-encoding genes [114] ; Furthermore, ST101 had already been isolated from pets in Italy [115]. One study has also shown that this clone survived in treated hospital wastewater, highlighting the highly adaptative potential of this clone [116].

CG20

The ST20 *K. pneumoniae* lineage carries ESBLs genes, mostly *bla*_{CTX-M-109}, *bla*_{CTX-M-14} , and *bla*_{CTX-M-15} but KPC-producing ST20 *K. pneumoniae* have already been isolated [117–119].

The first outbreak due to ST20 ESBLs producing *K. pneumoniae* was in China in 2012, followed by an outbreak in Greece the same year, where it was mostly reported in human

infections [120,121]. This clone is frequently the cause of outbreaks in neonatal care units, including an outbreak producing NDM-1 in 2015 in China, and has now been isolated sporadically in other parts of the world [118,119,122,123]. ST20 has already been isolated from hospital environments, in hand basins, producing carbapenemases [124].

What about hypervirulent clones?

One of the main current concerns is the emergence of *K. pneumoniae* clones carrying both virulence and antibiotic resistance determinants. Hypervirulent clones of *K. pneumoniae* (*hvKP*) emerged in Asia in the 1980s, and then disseminated worldwide, being responsible for bacteraemia with metastasis, mostly pyogenic liver abscesses but also endophthalmitis and meningitis[125]. Infections were mostly associated with isolates carrying a K1 or K2 capsular serotype and with CG23, CG65 (including ST65 and ST375), and CG86 clones. Identified virulence factors associated with hvKp are a positive string test, defining the hypermucoviscous phenotype, and genes associated with the hypermucoid phenotype such as *rmpA* (regulator of mucoid phenotype A), *rmpA2*, *magA* (mucoviscosity-associated gene A) or *wcaG* (GDP-fucose synthetase of the capsular *cps* locus), which can be located on a virulence plasmid pLVKP (Genbank AY378100). At first, these clones were characterised by their high-level susceptibility to antibiotics, suggesting that virulence and resistance were inversely correlated. In recent years, the first *K. pneumoniae* clones carrying both virulent and antibiotic resistance genes have been detected, mostly in Asia. KPC-producing *K. pneumoniae* belonging to the ST11 were detected in patients in China with a hypervirulent phenotype[36,126,127]. Other STs (such as ST15, ST307 and ST101 cited above) have now also been found carrying both hypervirulent and antibiotic resistance genes [36,39,45,89,112].

Conclusions and perspectives

The discovery of new antibiotics and antibiotic resistance have evolved concomitantly throughout the 20th century. However, since the end of the 20th century, antimicrobial resistance has emerged globally and rapidly spread worldwide, while fewer and fewer new antibiotics have been made available [128]. Massive or inappropriate use of antibiotics in human and animal medicines, as well as in agriculture, are partly responsible for this dissemination [128–130]. The increase of international trade and travel, as well as the increase of population density, are also contributing factors [131]. The massive use of non-antibiotic compounds such as herbicides may also be implicated [132]. Factors related to the bacteria also favour the acquisition and transfer of antibiotic resistance genes, which explains why some species appear to be more receptive to accumulate multidrug resistance than others. This is the case for *K. pneumoniae*, the topic of this review, for which we have detailed the CC-associated MDR. Thus, some antibiotic resistance genes have been more associated with certain CCs, as well as capsular or virulence gene acquisition features that may explain why some isolates can disseminate and/or resist more easily in humans or in the environment. The identification of the reservoir of these clones, in animals and in the environment through a more global “One Health” approach, should be considered in order to better understand the movements and transfers allowing the diffusion of these clones. Further work is also warranted to better understand the factors that allow these clones to spread and accumulate resistance to antibiotics.

Funding information: This work was supported by the French Government under the “Investissements d’avenir” (Investments for the Future) programme managed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, fr: National Agency for Research), (reference: Méditerranée Infection 10-IAHU-03). This work was supported by Région Provence Alpes Côte d’Azur and European ERDF PRIMI funding.

Acknowledgment:

Conflict of interest: The authors declare that they have no competing interests.

Authors’ contributions

All authors designed the study, drafted and revised the manuscript.

All authors have read and approved the final manuscript

References

- [1] Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat Rev Microbiol 2020. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>.
- [2] Long SW, Linson SE, Ojeda Saavedra M, Cantu C, Davis JJ, Brettin T, et al. Whole-Genome Sequencing of a Human Clinical Isolate of the Novel Species *Klebsiella quasivariicola* sp. nov. Genome Announc 2017;5. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01057-17>.
- [3] Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. Crit Rev Food Sci Nutr 2017;57:2857–76. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077192>.
- [4] Christaki E, Marcou M, Tofarides A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. J Mol Evol 2020;88:26–40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>.
- [5] Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiol Mol Biol Rev 2010;74:417–33. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>.
- [6] Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev 2017;41:252–75. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>.
- [7] European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018 2019.
- [8] Gomez-Simmonds A, Uhlemann A-C. Clinical Implications of Genomic Adaptation and Evolution of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. J Infect Dis 2017; 215:S18–27. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw378>.
- [9] Mathers AJ, Crook D, Vaughan A, Barry KE, Vegesana K, Stoesser N, et al. *Klebsiella quasipneumoniae* Provides a Window into Carbapenemase Gene Transfer, Plasmid Rearrangements, and Patient Interactions with the Hospital Environment. Antimicrob Agents Chemother 2019;63:e02513-18, /aac/63/6/AAC.02513-18.atom. <https://doi.org/10.1128/AAC.02513-18>.
- [10] Rodríguez-Medina N, Barrios-Camacho H, Duran-Bedolla J, Garza-Ramos U. *Klebsiella variicola*: an emerging pathogen in humans. Emerg Microbes Infect 2019;8:973–88. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1634981>.
- [11] Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. J Clin Microbiol 2005;43:4178–82. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005>.
- [12] Jolley KA, Bliss CM, Bennett JS, Bratcher HB, Brehony C, Colles FM, et al. Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. Microbiology 2012;158:1005–15. <https://doi.org/10.1099/mic.0.055459-0>.

- [13] Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, Passet V, Jones L, Delannoy-Vieillard A-S, et al. Genomic Definition of Hypervirulent and Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clonal Groups. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1812–20. <https://doi.org/10.3201/eid2011.140206>.
- [14] Maiden MCJ, van Rensburg MJJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:728–36. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3093>.
- [15] Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1151–61. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>.
- [16] Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, et al. 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. *Clin Infect Dis* 2004;39:55–60. <https://doi.org/10.1086/421495>.
- [17] Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, et al. Molecular Epidemiology of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the United States: Clonal Expansion of Multilocus Sequence Type 258. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3365–70. <https://doi.org/10.1128/AAC.00126-09>.
- [18] Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, et al. First Report on a Hyperepidemic Clone of KPC-3-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel Genetically Related to a Strain Causing Outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:818–20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00987-08>.
- [19] Samuelsen O, Naseer U, Tofield S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:654–8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp018>.
- [20] Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev* 2015;28:565–91. <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-14>.
- [21] the EuSCAPE Working Group, the ESGEM Study Group, David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol* 2019;4:1919–29. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0492-8>.
- [22] Marsh JW, Mustapha MM, Griffith MP, Evans DR, Ezeonwuka C, Pasculle AW, et al. Evolution of Outbreak-Causing Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258 at a Tertiary Care Hospital over 8 Years. *MBio* 2019;10. <https://doi.org/10.1128/mBio.01945-19>.
- [23] Yang F, Deng B, Liao W, Wang P, Chen P, Wei J. High rate of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from human and animal origin. *Infect Drug Resist* 2019;Volume 12:2729–37. <https://doi.org/10.2147/IDR.S219155>.

- [24] Silva-Sanchez J, Barrios-Camacho H, Hernández-Rodríguez E, Duran-Bedolla J, Sanchez-Perez A, Martínez-Chavarría LC, et al. Molecular characterization of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 isolated from bovine mastitis. *Braz J Microbiol* 2021;52:1029–36. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00445-y>.
- [25] Jelić M, Hrenović J, Dekić S, Goić-Barišić I, Tambić Andrašević A. First evidence of KPC-producing ST258 *Klebsiella pneumoniae* in river water. *J Hosp Infect* 2019;103:147–50. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.04.001>.
- [26] Burgos-Garay M, Ganim C, de Man TJB, Davy T, Mathers AJ, Kotay S, et al. Colonization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a sink-drain model biofilm system. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2020:1–9. <https://doi.org/10.1017/ice.2020.1287>.
- [27] Chen L, Mathema B, Pitout JDD, DeLeo FR, Kreiswirth BN. Epidemic *Klebsiella pneumoniae* ST258 Is a Hybrid Strain. *MBio* 2014;5. <https://doi.org/10.1128/mBio.01355-14>.
- [28] DeLeo FR, Chen L, Porcella SF, Martens CA, Kobayashi SD, Porter AR, et al. Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111:4988–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321364111>.
- [29] Lam MMC, Wyres KL, Judd LM, Wick RR, Jenney A, Brisse S, et al. Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Genome Med* 2018;10. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0587-5>.
- [30] Ernst CM, Braxton JR, Rodriguez-Orsorio CA, Zagieboylo AP, Li L, Pironti A, et al. Adaptive evolution of virulence and persistence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Med* 2020;26:705–11. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0825-4>.
- [31] Mavroidi A, Katsiari M, Likousi S, Palla E, Roussou Z, Nikolaou C, et al. Characterization of ST258 Colistin-Resistant, *bla*_{KPC}-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek Hospital. *Microb Drug Resist* 2016;22:392–8. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0282>.
- [32] Galani I, Antoniadou A, Karaikos I, Kontopoulou K, Giamarellou H, Souli M. Genomic characterization of a KPC-23-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clinical isolate resistant to ceftazidime-avibactam. *Clin Microbiol Infect* 2019;25:763.e5-763.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.011>.
- [33] Lai Y-C, Lu M-C, Hsueh P-R. Hypervirulence and carbapenem resistance: two distinct evolutionary directions that led high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones to epidemic success. *Expert Rev Mol Diagn* 2019;19:825–37. <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1649145>.
- [34] Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, et al. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* Species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3579–83. <https://doi.org/10.1128/AAC.01783-10>.

- [35] Zhang R, Liu L, Zhou H, Chan EW, Li J, Fang Y, et al. Nationwide Surveillance of Clinical Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) Strains in China. *EBioMedicine* 2017;19:98–106. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.04.032>.
- [36] Gu D, Dong N, Zheng Z, Lin D, Huang M, Wang L, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. Gu Dong N Zheng Z Lin Huang M Wang ... Chen 2018 Fatal Outbreak ST11 Carbapenem-Resist Hypervirulent *Kleb Pneumoniae* Chin Hosp Mol Epidemiol Study *Lancet Infect Dis* 181 37–46 Doi101016s1473-30991730489-9 2018;18:37–46. [https://doi.org/Gu, D., Dong, N., Zheng, Z., Lin, D., Huang, M., Wang, L., ... Chen, S. \(2018\). A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. The Lancet Infectious Diseases, 18\(1\), 37–46. doi:10.1016/s1473-3099\(17\)30489-9](https://doi.org/Gu, D., Dong, N., Zheng, Z., Lin, D., Huang, M., Wang, L., ... Chen, S. (2018). A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent Klebsiella pneumoniae in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. The Lancet Infectious Diseases, 18(1), 37–46. doi:10.1016/s1473-3099(17)30489-9).
- [37] Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol* 2014;22:686–96. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.003>.
- [38] Liu Y, Zhang X, Cai L, Zong Z. Enhanced survival of ST-11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2020;41:740–2. <https://doi.org/10.1017/ice.2020.68>.
- [39] Zhao J, Liu C, Liu Y, Zhang Y, Xiong Z, Fan Y, et al. Genomic characteristics of clinically important ST11 *Klebsiella pneumoniae* strains worldwide. *J Glob Antimicrob Resist* 2020;22:519–26. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.03.023>.
- [40] Liao W, Liu Y, Zhang W. Virulence evolution, molecular mechanisms of resistance and prevalence of ST11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: A review over the last 10 years. *J Glob Antimicrob Resist* 2020;23:174–80. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.09.004>.
- [41] Zeng L, Zhang J, Li C, Fu Y, Zhao Y, Wang Y, et al. The determination of *gyrA* and *parC* mutations and the prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in carbapenem resistant *Klebsiella pneumonia* ST11 and ST76 strains isolated from patients in Heilongjiang Province, China. *Infect Genet Evol* 2020;82:104319. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104319>.
- [42] Damjanova I, Toth A, Paszti J, Hajbel-Vekony G, Jakab M, Berta J, et al. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new “MRSA”s”? *J Antimicrob Chemother* 2008;62:978–85. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn287>.
- [43] Shen Z, Ding B, Ye M, Wang P, Bi Y, Wu S, et al. High ceftazidime hydrolysis activity and porin OmpK35 deficiency contribute to the decreased susceptibility to ceftazidime/avibactam in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:1930–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx066>.
- [44] Dong N, Yang X, Zhang R, Chan EW-C, Chen S. Tracking microevolution events among ST11 carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* outbreak strains. *Emerg Microbes Infect* 2018;7:1–8. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0146-6>.

- [45] Marques C, Menezes J, Belas A, Aboim C, Cavaco-Silva P, Trigueiro G, et al. *Klebsiella pneumoniae* causing urinary tract infections in companion animals and humans: population structure, antimicrobial resistance and virulence genes. J Antimicrob Chemother 2019;74:594–602. <https://doi.org/10.1093/jac/dky499>.
- [46] Jin L, Wang R, Wang X, Wang Q, Zhang Y, Yin Y, et al. Emergence of *mcr-1* and carbapenemase genes in hospital sewage water in Beijing, China. J Antimicrob Chemother 2018;73:84–7. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx355>.
- [47] Poirel L, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Bernabeu S, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman. J Antimicrob Chemother 2011;66:304–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq428>.
- [48] Peirano G, Ahmed-Bentley J, Fuller J, Rubin JE, Pitout JDD. Travel-Related Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria in Alberta, Canada: the First 3 Years. J Clin Microbiol 2014;52:1575–81. <https://doi.org/10.1128/JCM.00162-14>.
- [49] Tolentino FM, Bueno MFC, Franscisco GR, Barcelos DD de P, Lobo SM, Tomaz FMMB, et al. Endemicity of the High-Risk Clone *Klebsiella pneumoniae* ST340 Coproducing QnrB, CTX-M-15, and KPC-2 in a Brazilian Hospital. Microb Drug Resist 2019;25:528–37. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0006>.
- [50] Novović K, Trudić A, Brkić S, Vasiljević Z, Kojić M, Medić D, et al. Molecular Epidemiology of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Serbia from 2013 to 2016. Antimicrob Agents Chemother 2017;61:e02550-16, e02550-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02550-16>.
- [51] Netikul T, Kiratisin P. Genetic Characterization of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae and the Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST340 at a University Hospital in Thailand. PLOS ONE 2015;10:e0139116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139116>.
- [52] Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, et al. An update of the evolving epidemic of *bla_{KPC-2}*-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). J Antimicrob Chemother 2011;66:1510–3. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr166>.
- [53] Cerdeira L, Fernandes MR, Ienne S, Souza TA, de O. Garcia D, Lincopan N. Draft genome sequence of an environmental multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST340/CC258 harbouring *bla_{CTX-M-15}* and *bla_{KPC-2}* genes. J Glob Antimicrob Resist 2017;8:108–9. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.12.001>.
- [54] Cerdeira L, Silva KC, Fernandes MR, Ienne S, de Souza TA, de Oliveira Garcia D, et al. Draft genome sequence of a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 340 (clonal complex 258) isolate from a food-producing animal. J Glob Antimicrob Resist 2016;7:67–8. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.07.012>.
- [55] Valencia-Bacca J, Silva MM, Cerdeira L, Esposito F, Cardoso B, Muñoz ME, et al. Detection and Whole-Genome Analysis of a High-Risk Clone of *Klebsiella pneumoniae* ST340/CG258 Producing CTX-M-15 in a Companion Animal. Microb Drug Resist 2020;26:611–5. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0190>.

- [56] Warburg G, Hidalgo-Grass C, Partridge SR, Tolmasky ME, Temper V, Moses AE, et al. A carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* epidemic clone in Jerusalem: sequence type 512 carrying a plasmid encoding *aac(6')-Ib*. J Antimicrob Chemother 2012;67:898–901. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr552>.
- [57] López-Cerero L, Egea P, Gracia-Ahufinger I, González-Padilla M, Rodríguez-López F, Rodríguez-Baño J, et al. Characterisation of the first ongoing outbreak due to KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST512) in Spain. Int J Antimicrob Agents 2014;44:538–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.08.006>.
- [58] Conte V, Monaco M, Giani T, D'Ancona F, Moro ML, Arena F, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from invasive infections in Italy: increasing diversity with predominance of the ST512 clade II sublineage. J Antimicrob Chemother 2016;71:3386–91. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw337>.
- [59] Di Pilato V, Errico G, Monaco M, Giani T, Del Grosso M, Antonelli A, et al. The changing epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: toward polyclonal evolution with emergence of high-risk lineages. J Antimicrob Chemother 2020. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa431>.
- [60] Gharout-Sait A, Touati A, Ahmim M, Brasme L, Guillard T, Agsous A, et al. Occurrence of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Bat Guano. Microb Drug Resist 2019;25:1057–62. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0471>.
- [61] Coelho A, Mirelis B, Alonso-Tarrés C, Larrosa MN, Miró E, Abad RC, et al. Detection of three stable genetic clones of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Barcelona metropolitan area, Spain. J Antimicrob Chemother 2009;64:862–4. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp264>.
- [62] Peirano G, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JDD. Emerging Antimicrobial-Resistant High-Risk *Klebsiella pneumoniae* Clones ST307 and ST147. Antimicrob Agents Chemother 2020;64. <https://doi.org/10.1128/AAC.01148-20>.
- [63] Peirano G, Bradford PA, Kazmierczak KM, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JDD. Importance of Clonal Complex 258 and IncFK2-like Plasmids among a Global Collection of *Klebsiella pneumoniae* with *bla_{KPC}*. Antimicrob Agents Chemother 2017;61. <https://doi.org/10.1128/AAC.02610-16>.
- [64] Galani I, Karaikos I, Souli M, Papoutsaki V, Galani L, Gkoufa A, et al. Outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* endowed with ceftazidime-avibactam resistance mediated through a VEB-1-mutant (VEB-25), Greece, September to October 2019. Eurosurveillance 2020;25. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000028>.
- [65] Sonnevend Á, Ghazawi A, Hashmey R, Haidermota A, Girgis S, Alfaresi M, et al. Multihospital Occurrence of Pan-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 147 with an ISEcp1-Directed *bla_{OXA-181}* Insertion in the *mgrB* Gene in the United Arab Emirates. Antimicrob Agents Chemother 2017;61. <https://doi.org/10.1128/AAC.00418-17>.

- [66] Bathoorn E, Tsioutis C, da Silva Voorham JM, Scoulica EV, Ioannidou E, Zhou K, et al. Emergence of pan-resistance in KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Crete, Greece: a close call. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:1207–12. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv467>.
- [67] Avgoulea K, Di Pilato V, Zarkotou O, Sennati S, Politi L, Cannatelli A, et al. Characterization of Extensively Drug-Resistant or Pandrug-Resistant Sequence Type 147 and 101 OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* Causing Bloodstream Infections in Patients in an Intensive Care Unit. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62. <https://doi.org/10.1128/AAC.02457-17>.
- [68] Andersen JM, Shoup M, Robinson C, Britton R, Olsen KEP, Barrangou R. CRISPR Diversity and Microevolution in *Clostridium difficile*. *Genome Biol Evol* 2016;8:2841–55. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw203>.
- [69] Hamzaoui Z, Ocampo-Sosa A, Maamar E, Fernandez Martinez M, Ferjani S, Hammami S, et al. An Outbreak of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae*, Associated with OmpK35 and OmpK36 Porin Loss in Tunisia. *Microb Drug Resist* 2018;24:1137–47. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0165>.
- [70] Naha S, Sands K, Mukherjee S, Roy C, Rameez MJ, Saha B, et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 in a neonatal unit: Clonal isolates with differences in colistin susceptibility attributed to AcrAB-TolC pump. *Int J Antimicrob Agents* 2020;55:105903. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105903>.
- [71] Protonotariou E, Poulou A, Politi L, Sgouropoulos I, Metallidis S, Kachrimanidou M, et al. Hospital outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* ST147 clonal strain co-producing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases in a tertiary teaching hospital in Northern Greece. *Int J Antimicrob Agents* 2018;52:331–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.04.004>.
- [72] Tavoschi L, Forni S, Porretta A, Righi L, Pieralli F, Menichetti F, et al. Prolonged outbreak of New Delhi metallo-beta-lactamase-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriales* (NDM-CRE), Tuscany, Italy, 2018 to 2019. *Eurosurveillance* 2020;25. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.6.2000085>.
- [73] Potron A, Bernabeu S, Cuzon G, Pontès V, Blanchard H, Seringe E, et al. Analysis of OXA-204 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* reveals possible endoscopy-associated transmission, France, 2012 to 2014. *Eurosurveillance* 2017;22. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.49.17-00048>.
- [74] Ovejero CM, Escudero JA, Thomas-Lopez D, Hoefer A, Moyano G, Montero N, et al. Highly Tigecycline-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 11 (ST11) and ST147 Isolates from Companion Animals. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61. <https://doi.org/10.1128/AAC.02640-16>.
- [75] Zhang R, Li J, Wang Y, Shen J, Shen Z, Wang S. Presence of NDM in non-*E. coli* *Enterobacteriaceae* in the poultry production environment. *J Antimicrob Chemother* 2019;74:2209–13. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz193>.

- [76] Nüesch-Inderbilen M, Zurfluh K, Stevens MJA, Stephan R. Complete and assembled genome sequence of an NDM-9- and CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 wastewater isolate from Switzerland. *J Glob Antimicrob Resist* 2018;13:53–4. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.03.001>.
- [77] Habeeb MA, Haque A, Nematzadeh S, Iversen A, Giske CG. High prevalence of 16S rRNA methylase RmtB among CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* from Islamabad, Pakistan. *Int J Antimicrob Agents* 2013;41:524–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.02.017>.
- [78] Castanheira M, Farrell SE, Wanger A, Rolston KV, Jones RN, Mendes RE. Rapid Expansion of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Two Texas Hospitals due to Clonal Spread of ST258 and ST307 Lineages. *Microb Drug Resist* 2013;19:295–7. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0238>.
- [79] Wyres KL, Hawkey J, Hetland MAK, Fostervold A, Wick RR, Judd LM, et al. Emergence and rapid global dissemination of CTX-M-15-associated *Klebsiella pneumoniae* strain ST307. *J Antimicrob Chemother* 2019;74:577–81. <https://doi.org/10.1093/jac/dky492>.
- [80] Lowe M, Kock MM, Coetzee J, Hoosien E, Peirano G, Strydom K-A, et al. *Klebsiella pneumoniae* ST307 with *bla*_{OXA-181}, South Africa, 2014–2016. *Emerg Infect Dis* 2019;25:739–47. <https://doi.org/10.3201/eid2504.181482>.
- [81] Villa L, Feudi C, Fortini D, Brisse S, Passet V, Bonura C, et al. Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. *Microb Genomics* 2017;3. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000110>.
- [82] Cantón R, Gijón D, Ruiz-Garbajosa P. Antimicrobial resistance in ICUs: an update in the light of the COVID-19 pandemic. *Curr Opin Crit Care* 2020;26:433–41. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000755>.
- [83] Loconsole D, Accogli M, De Robertis AL, Capozzi L, Bianco A, Morea A, et al. Emerging high-risk ST101 and ST307 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones from bloodstream infections in Southern Italy. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2020;19:24. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00366-y>.
- [84] Strydom KA, Chen L, Kock MM, Stoltz AC, Peirano G, Nobrega DB, et al. *Klebsiella pneumoniae* ST307 with OXA-181: threat of a high-risk clone and promiscuous plasmid in a resource-constrained healthcare setting. *J Antimicrob Chemother* 2020;75:896–902. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz550>.
- [85] Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom K-A, Matsumura Y. The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev* 2019;33. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-19>.
- [86] Di Tella D, Tamburro M, Guerrizio G, Fanelli I, Sammarco ML, Ripabelli G. Molecular Epidemiological Insights into Colistin-Resistant and Carbapenemases-Producing Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Infect Drug Resist* 2019;Volume 12:3783–95. <https://doi.org/10.2147/IDR.S226416>.

- [87] Baron SA, Cassir N, Hamel M, Hadjadj L, Saidani N, Dubourg G, et al. Risk factors for acquisition of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* and expansion of a colistin-resistant ST307 epidemic clone in hospitals in Marseille, France, 2014 to 2017. *Eurosurveillance* 2021;26. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.21.2000022>.
- [88] Sánchez-López J, Cantón R. Current status of ESKAPE microorganisms in Spain: Epidemiology and resistance phenotypes. *Rev Espanola Quimioter Publicacion Of Soc Espanola Quimioter* 2019;32 Suppl 2:27–31.
- [89] Heiden SE, Hübner N-O, Bohnert JA, Heidecke C-D, Kramer A, Balau V, et al. A *Klebsiella pneumoniae* ST307 outbreak clone from Germany demonstrates features of extensive drug resistance, hypermucoviscosity, and enhanced iron acquisition. *Genome Med* 2020;12. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00814-6>.
- [90] Turton J, Davies F, Turton J, Perry C, Payne Z, Pike R. Hybrid Resistance and Virulence Plasmids in “High-Risk” Clones of *Klebsiella pneumoniae*, Including Those Carrying bla_{NDM-5}. *Microorganisms* 2019;7:326. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090326>.
- [91] Calhau V, Ribeiro G, Mendonça N, Da Silva GJ. Prevalent combination of virulence and plasmidic-encoded resistance in ST131 *Escherichia coli* strains. *Virulence* 2013;4:726–9. <https://doi.org/10.4161/viru.26552>.
- [92] Lee C-R, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol* 2016;7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00895>.
- [93] Shi Q, Han R, Guo Y, Zheng Y, Yang Y, Yin D, et al. Emergence of ST15 *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Producing Plasmids-Mediated RmtF and OXA-232 in China. *Infect Drug Resist* 2020;Volume 13:3125–9. <https://doi.org/10.2147/IDR.S257298>.
- [94] Berglund B, Hoang NTB, Tärnberg M, Le NK, Nilsson M, Khu DTK, et al. Molecular and phenotypic characterization of clinical isolates belonging to a KPC-2-producing strain of ST15 *Klebsiella pneumoniae* from a Vietnamese pediatric hospital. *Antimicrob Resist Infect Control* 2019;8. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0613-4>.
- [95] Hu L, Zhong Q, Tu J, Xu Y, Qin Z, Parsons C, et al. Emergence of bla_{NDM-1} among *Klebsiella pneumoniae* ST15 and novel ST1031 clinical isolates in China. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;75:373–6. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.01.006>.
- [96] Markovska R, Stoeva T, Schneider I, Boyanova L, Popova V, Dacheva D, et al. Clonal dissemination of multilocus sequence type ST15 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. *APMIS* 2015;123:887–94. <https://doi.org/10.1111/apm.12433>.
- [97] Alouache S, Estepa V, Messai Y, Ruiz E, Torres C, Bakour R. Characterization of ESBLs and Associated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates from an Urban Wastewater Treatment Plant in Algeria. *Microb Drug Resist* 2014;20:30–8. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0264>.

- [98] Ekwanzala MD, Dewar JB, Kamika I, Momba MNB. Tracking the environmental dissemination of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* using whole genome sequencing. *Sci Total Environ* 2019;691:80–92. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.533>.
- [99] Giske CG, Fröding I, Hasan CM, Turlej-Rogacka A, Toleman M, Livermore D, et al. Diverse Sequence Types of *Klebsiella pneumoniae* Contribute to the Dissemination of *bla*_{NDM-1} in India, Sweden, and the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2735–8. <https://doi.org/10.1128/AAC.06142-11>.
- [100] Zhu J, Sun L, Ding B, Yang Y, Xu X, Liu W, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST76 and ST37 isolates in neonates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016;35:611–8. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2578-z>.
- [101] Guo Q, Spychala CN, McElheny CL, Doi Y. Comparative analysis of an IncR plasmid carrying *armA*, *bla*_{DHA-1} and *qnrB4* from *Klebsiella pneumoniae* ST37 isolates. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:882–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv444>.
- [102] Lopez-Camacho E, Gomez-Gil R, Tobes R, Manrique M, Lorenzo M, Galvan B, et al. Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:632–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt419>.
- [103] Li P, Wang M, Li X, Hu F, Yang M, Xie Y, et al. ST37 *Klebsiella pneumoniae*: development of carbapenem resistance *in vivo* during antimicrobial therapy in neonates. *Future Microbiol* 2017;12:891–904. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0165>.
- [104] Yang J, Ye L, Guo L, Zhao Q, Chen R, Luo Y, et al. A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E509–15. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12275>.
- [105] Bedenić B, Mazzariol A, Plečko V, Bošnjak Z, Barl P, Vraneš J, et al. First report of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. *J Chemother* 2012;24:237–9. <https://doi.org/10.1179/1973947812Y.0000000017>.
- [106] Richter SN, Frasson I, Franchin E, Bergo C, Lavezzo E, Barzon L, et al. KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009–December 2011: massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. *Gut Pathog* 2012;4:7. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-4-7>.
- [107] Lepuschitz S, Hauser K, Schriebl A, Schlagenhaufen C, Stöger A, Chakeri A, et al. Fecal *Klebsiella pneumoniae* Carriage Is Intermittent and of High Clonal Diversity. *Front Microbiol* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581081>.
- [108] Xia J, Fang L-X, Cheng K, Xu G-H, Wang X-R, Liao X-P, et al. Clonal Spread of 16S rRNA Methyltransferase-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST37 with High Prevalence of ESBLs from Companion Animals in China. *Front Microbiol* 2017;08. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00529>.

- [109] Seki LM, Pereira PS, de Souza M da PAH, Conceição M de S, Marques EA, Porto CO, et al. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:274–7. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.01.006>.
- [110] Mammina C, Bonura C, Aleo A, Fasciana T, Brunelli T, Pesavento G, et al. Sequence type 101 (ST101) as the predominant carbapenem-non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* clone in an acute general hospital in Italy. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:543–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.02.012>.
- [111] Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Adembri C, Dell’utri P, Santagati M, et al. Emergence of an extensively drug-resistant ArmA- and KPC-2-producing ST101 *Klebsiella pneumoniae* clone in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:1932–4. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt116>.
- [112] Roe CC, Vazquez AJ, Esposito EP, Zarrilli R, Sahl JW. Diversity, Virulence, and Antimicrobial Resistance in Isolates From the Newly Emerging *Klebsiella pneumoniae* ST101 Lineage. *Front Microbiol* 2019;10:542. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00542>.
- [113] Del Franco M, Paone L, Novati R, Giacomazzi CG, Bagattini M, Galotto C, et al. Molecular epidemiology of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* in Valle d’Aosta region, Italy, shows the emergence of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 101 (ST101 and ST1789). *BMC Microbiol* 2015;15:260. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0597-z>.
- [114] Chaalal N, Touati A, Bakour S, Aissa MA, Sotto A, Lavigne J-P, et al. Spread of OXA-48 and NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST48 and ST101 in Chicken Meat in Western Algeria. *Microb Drug Resist* 2021;27:492–500. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0419>.
- [115] Donati V, Feltrin F, Hendriksen RS, Svendsen CA, Cordaro G, García-Fernández A, et al. Extended-Spectrum-Beta-Lactamases, AmpC Beta-Lactamases and Plasmid Mediated Quinolone Resistance in *Klebsiella spp.* from Companion Animals in Italy. *PLoS ONE* 2014;9:e90564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090564>.
- [116] Popa LI, Gheorghe I, Barbu IC, Surleac M, Paraschiv S, Măruțescu L, et al. Multidrug Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST101 Clone Survival Chain From Inpatients to Hospital Effluent After Chlorine Treatment. *Front Microbiol* 2021;11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.610296>.
- [117] Ko KS, Yeom J-S, Lee MY, Peck KR, Song J-H. Clonal Dissemination of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a Korean Hospital. *J Korean Med Sci* 2008;23:53. <https://doi.org/10.3346/jkms.2008.23.1.53>.
- [118] Ruiz-Garbajosa P, Curiao T, Tato M, Gijon D, Pintado V, Valverde A, et al. Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:2487–92. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt237>.

- [119] Freeman JT, Rubin J, McAuliffe GN, Peirano G, Roberts SA, Drinković D, et al. Differences in risk-factor profiles between patients with ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a multicentre case-case comparison study. *Antimicrob Resist Infect Control* 2014;3. <https://doi.org/10.1186/2047-2994-3-27>.
- [120] Patil S, Chen X, Wen F. Exploring the phenotype and genotype of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* harbouring *bla*_{CTX-M} group extended-spectrum β -lactamases recovered from paediatric clinical cases in Shenzhen, China. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2019;18:32. <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0331-z>.
- [121] Mavroidi A, Liakopoulos A, Gounaris A, Goudesidou M, Gaitana K, Miriagou V, et al. Successful control of a neonatal outbreak caused mainly by ST20 multidrug-resistant SHV-5-producing *Klebsiella pneumoniae*, Greece. *BMC Pediatr* 2014;14. <https://doi.org/10.1186/1471-2431-14-105>.
- [122] Yu J, Tan K, Rong Z, Wang Y, Chen Z, Zhu X, et al. Nosocomial outbreak of KPC-2- and NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal ward: a retrospective study. *BMC Infect Dis* 2016;16. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1870-y>.
- [123] Peirano G, Hung King Sang J, Pitondo-Silva A, Laupland KB, Pitout JDD. Molecular epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* over a 10 year period in Calgary, Canada. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1114–20. <https://doi.org/10.1093/jac/dks026>.
- [124] Qiao F, Wei L, Feng Y, Ran S, Zheng L, Zhang Y, et al. Handwashing Sink Contamination and Carbapenem-resistant *Klebsiella* Infection in the Intensive Care Unit: A Prospective Multicenter Study. *Clin Infect Dis* 2020;71:S379–85. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1515>.
- [125] Siu LK, Yeh K-M, Lin J-C, Fung C-P, Chang F-Y. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. *Lancet Infect Dis* 2012;12:881–7. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70205-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70205-0).
- [126] Wei D, Wan L-G, Deng Q, Liu Y. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* hypervirulent clone of capsular serotype K1 that belongs to sequence type 11 in Mainland China. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016;85:192–4. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.012>.
- [127] Zhang L, Li Y, Shen W, Wang SM, Wang G, Zhou Y. Whole-genome sequence of a carbapenem-resistant hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* isolate SWU01 with capsular serotype K47 belonging to ST11 from a patient in China. *J Glob Antimicrob Resist* 2017;11:87–9. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.09.001>.
- [128] McEwen SA, Collignon PJ. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. In: Schwarz, Cavaco, Shen, editors. *Antimicrob. Resist. Bact. Livest. Companion Anim.*, American Society of Microbiology; 2018, p. 521–47. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>.
- [129] Xiong W, Sun Y, Zeng Z. Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. *Environ Sci Pollut Res* 2018;25:18377–84. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1852-2>.

- [130] Brinkac L, Voorhies A, Gomez A, Nelson KE. The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome. *Microb Ecol* 2017;74:1001–8. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0985-z>.
- [131] Frost I, Van Boeckel TP, Pires J, Craig J, Laxminarayan R. Global geographic trends in antimicrobial resistance: the role of international travel. *J Travel Med* 2019;26. <https://doi.org/10.1093/jtm/taz036>.
- [132] Raoult D, Hadjadj L, Baron SA, Rolain J-M. Role of glyphosate in the emergence of antimicrobial resistance in bacteria? *J Antimicrob Chemother* 2021. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab102>.
- [133] Zurfluh K, Nüesch-Inderbinen M, Morach M, Zihler Berner A, Hächler H, Stephan R. Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolated from Vegetables Imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. *Appl Environ Microbiol* 2015;81:3115–20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00258-15>.
- [134] Lee C-S, Vasoo S, Hu F, Patel R, Doi Y. *Klebsiella pneumoniae* ST147 Coproducing NDM-7 Carbapenemase and RmtF 16S rRNA Methyltransferase in Minnesota. *J Clin Microbiol* 2014;52:4109–10. <https://doi.org/10.1128/JCM.01404-14>.
- [135] Liapis E, Pantel A, Robert J, Nicolas-Chanoine M-H, Cavalié L, van der Mee-Marquet N, et al. Molecular epidemiology of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in France. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:O1121–3. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12727>.
- [136] Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JDD. Surveillance and Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Isolates That Produce Carbapenemases: First Report of OXA-48-Like Enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:130–6. <https://doi.org/10.1128/AAC.01686-12>.

Tables and Figures

Table: 1

Table 1. Characteristics of the international multidrug resistant clones of *Klebsiella pneumoniae*

Figures: 2

Figure 1. Chronology of the emergence of resistance and the appearance of clones

Figure 2. MSLT and distance relation between the different major clones

Table 1. Characteristics of the international multidrug resistant clones of *Klebsiella pneumoniae*

Clone identity		First detection - Emergence		Spread	Origin of sample	Antibiotic resistance		Other characteristics	References
CC	ST of importance in the CC	First detection (year)	Geographical location of first detection	Continent (country)		Antibiotic family	AMR enzymes		
258	ST258, ST11, ST340, ST512	2000 1997 2010 NA	US France Oman Israel	North America (US) Europe (Italy, Greece, Israel, Norway, Sweden) Asia (China, SE Asia) Middle-East Oceania (Australia) Africa	H, DoA, E H, DoA, CoA, E H, DoA, CoA, E H, Wildlife	Carbapenemases ESBL Colistin Ceftazidim-avibactam Fluoroquinolone	KPCs NDMs VIMs OXAs CTX-Ms SHV TEM	ST258: hybrid of ST11 and ST442-like strain clade I: <i>wzi29</i> clade II: <i>wiz154</i> ST11: virulence factors (<i>ompA2</i> and aerobactin) ST512: differs from ST258 by a C176A tranversion in the gapA locus; invariably associated with <i>cps-2</i>	Insérer à la fin
15	ST15, ST14, ST277, ST326, ST709	NA	NA	Africa Europe America (Canada) Asia (China, Thailand)	H, CoA, E	Carbapenemases ESBL Fluoroquinolone	NDM-1 KPC-2 CTX-M-15	Virulence	Insérer à la fin
37	ST37	1996	US	Asia (China) Europe	H , CoA	ESBL, AmpC Carbapenemase Colistin	OXA-1 NDM-1 KPC-2 KPC-3		[18,100 – 104,106 –108]
147	ST147	2005 2007	Hungary Spain	Africa Asia Europe North America South America Oceania	H , CoA, DoA E	ESBL Carbapenemases Fluoroquinolone Colistin	CTX-M-15 SHVs KPC-2, NDM-1 NDM-7 OXA-48, OXA-181 OXA-204	Conservative arrays in CRISPR region 1	[42,52,61,62,65, 67,73– 76,99,133–136]

307	ST307	2008 2009 2010	Netherlands Pakistan Texas	Africa (South Africa) Asia (Korea, Pakistan) Europe (Italy, France) America (US)	H; CoA; E, Wildlife	ESBL Carbapenemases Colistin	CTX-M-15 KPC-2 KPC-3 OXA-48 OXA-181 NDM-1 VIM-1 Chromosomal mutations	K and O loci shared in all isolates <i>wzi173</i> 4 main lineages (global, Texas, two South African)	Insérer à la fin
101	ST101 ST1789	2009 2013	Rio de Janeiro Italy	Europe Asia Africa America	H, DoA, CoA, E	ESBL Carbapenemases Colistin Fluoroquinolones	CTX-M-15 CTX-M-14 OXA-48 KPC-2 KPC-3 NDM-1	Virulence factors	[83,109, 112– 116]
20	ST20 ST17 ST18 ST21 ST26 ST32	NA		Asia (China, Korea) Oceania (New- Zealand) Europe	H, E	ESBL Carbapenemases	CTX-M-109 CTX-M-14 CTX-M-15 SHV-5 KPC-2	Infections in neonates wards	[118,11 9,122– 124]

CoA: Companion animals (pets) ; DoA: Domestic animals; E: Environmental samples; H: Human; #PubMLST, unpublished, SE: South-East;
US: United States

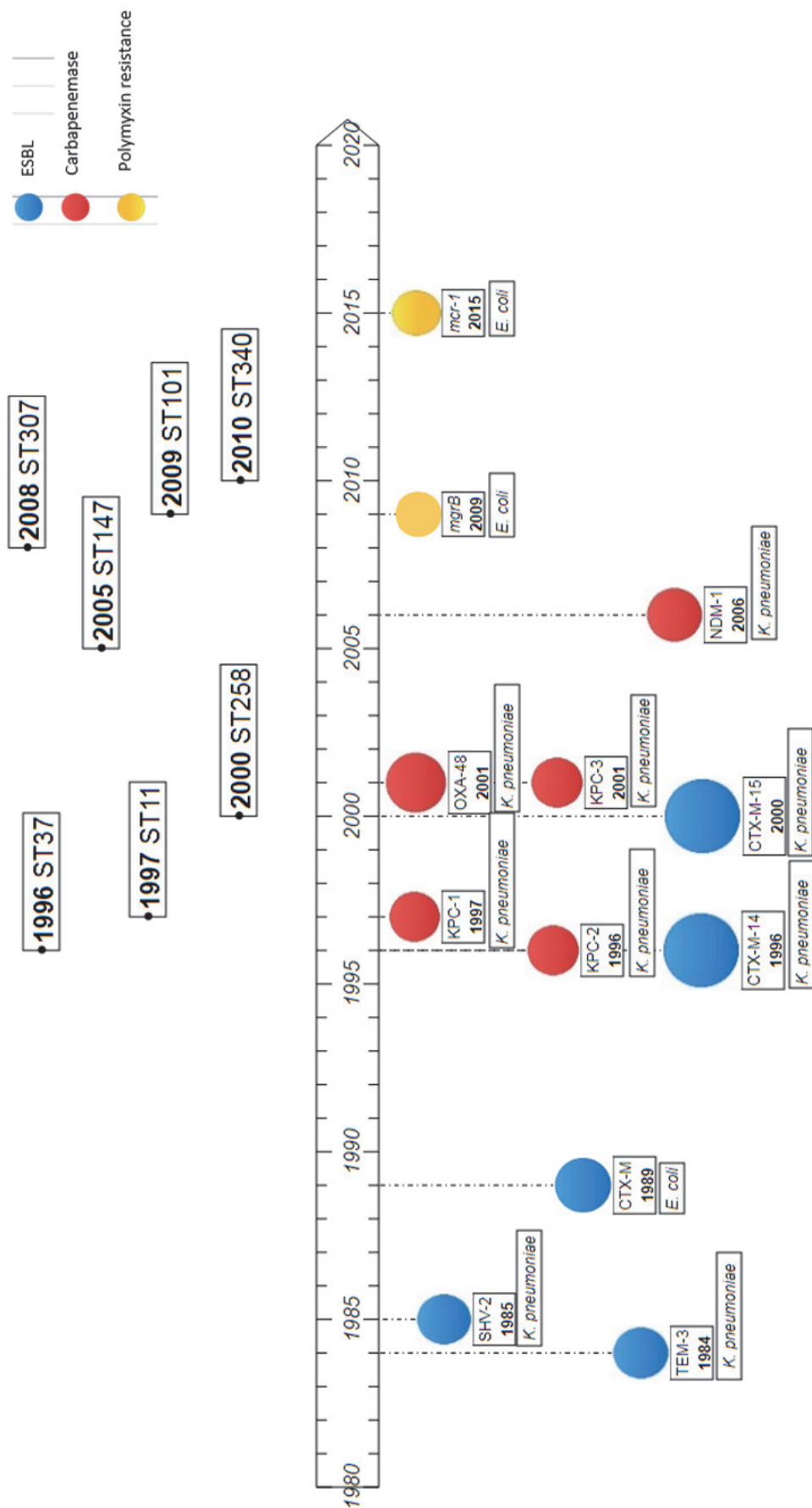
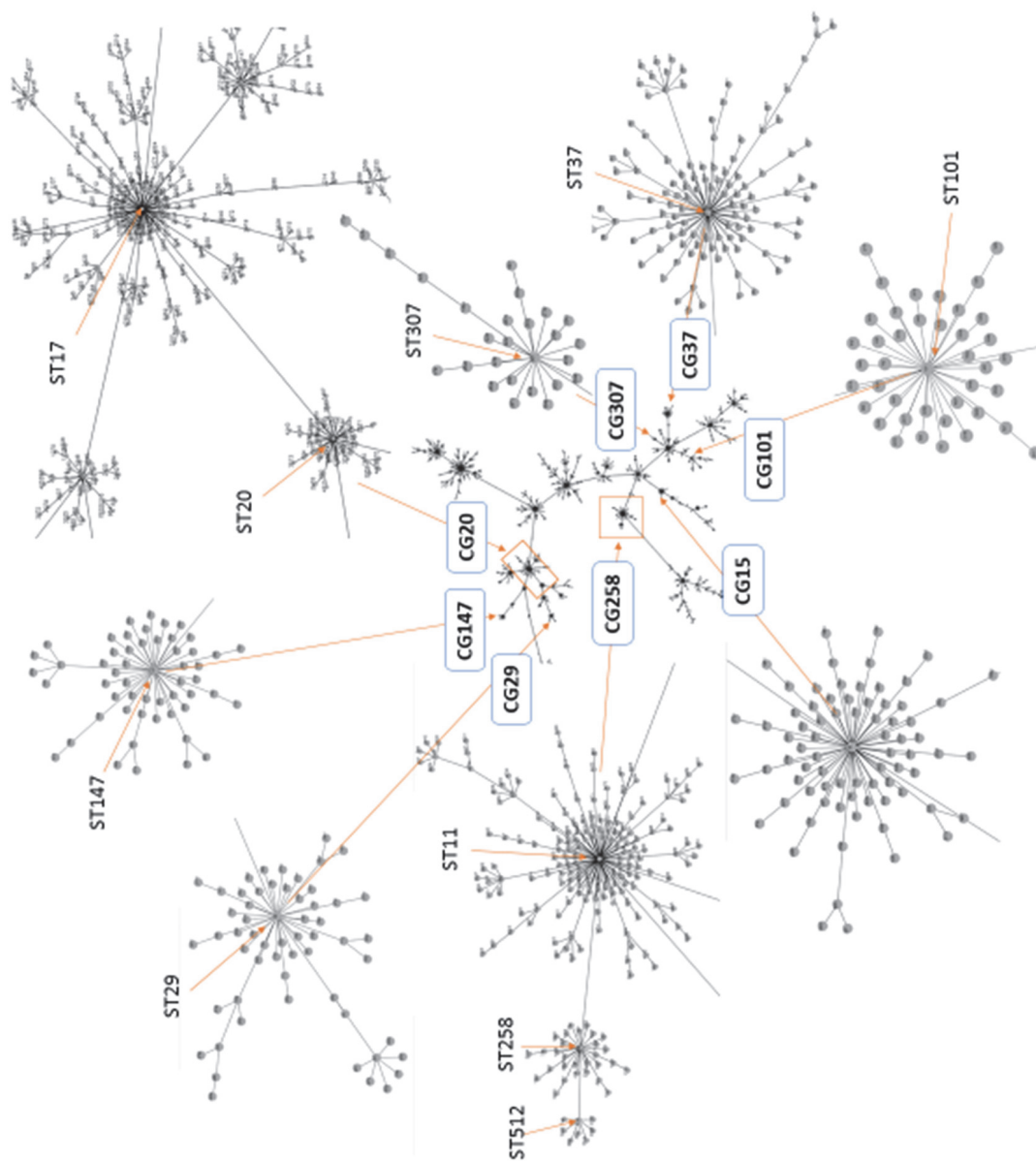


Figure 1. Chronology of the emergence of resistance and the appearance of clones



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Tout au long du 20^{ème} siècle, la découverte de nouvelles molécules antibiotiques et l'émergence de résistances aux antibiotiques ont évolué parallèlement. Cependant, dès la fin du 20^{ème} siècle, la résistance aux antimicrobiens s'est rapidement répandue dans le monde entier, alors que de moins en moins de nouveaux antibiotiques ont été mis à disposition sur le marché. Cette dissémination des résistances est liée à plusieurs facteurs, comme l'utilisation massive et inappropriée des antibiotiques en santé humaine et animale, ainsi que dans l'agroalimentaire. Elle est également liée aux transferts transfrontaliers des patients et des voyageurs et à l'accroissement des populations. L'utilisation de composés chimiques non antibiotiques tels que les herbicides sont également des facteurs qui pourraient contribuer à cette résistance.

A travers cette thèse et cette revue, c'est davantage les facteurs liés à la bactérie qui nous intéressent. La plasticité génomique de *K. pneumoniae* lui permet d'acquérir et de transférer facilement des gènes de résistance grâce aux TLG par les transposons et les plasmides, et on a vu son épidémiologie changer au cours des deux dernières décennies. Cette espèce, de par sa capacité à accumuler les gènes de multi-résistance, en fait une véritable menace pour la santé publique. Afin de mieux comprendre son épidémiologie, nous avons détaillé pour chaque CC leurs caractéristiques et les gènes de résistance associés. Ainsi, on a pu identifier des associations entre gènes de résistance et certains CC, ainsi que des facteurs de virulence, qui pourraient expliquer la meilleure diffusion de certains clones chez l'homme et dans l'environnement. Une approche plus globale pour mieux discerner le réservoir de ces clones chez les hommes et dans l'environnement devrait être envisagée pour mieux comprendre les mouvements et les transferts à l'origine de la circulation de ces clones. Des travaux complémentaires sont également nécessaires pour mieux comprendre les facteurs qui permettent à ces clones de diffuser et d'accumuler les résistances aux antibiotiques.

En pratique clinique, l'identification en temps réel des sous-populations clonales de *K. pneumoniae* par séquençage génomique à haut débit permettrait d'améliorer la prise en charge du patient, et d'adapter rapidement l'antibiothérapie.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Résumé

Klebsiella pneumoniae est une bactérie pathogène opportuniste souvent multi-résistante (MDR) qui affecte les humains, fréquemment responsable d'infections sévères dans le monde entier, et qui est associée à un taux de mortalité élevé chez les patients hospitalisés. Ces deux dernières décennies, de nombreuses études ont rapporté une augmentation du taux de résistance à certains antibiotiques, notamment aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) et aux carbapénèmes. Certains complexes clonaux (CC) caractérisés par leur multi-résistance ont été identifiés comme étant à l'origine d'épidémies hospitalières sur tous les continents, ce qui constitue une véritable menace pour la santé publique.

L'objectif de cette thèse est de relater l'émergence et l'expansion de ces clones de *K. pneumoniae* à haut risque épidémique, et de discerner leurs caractéristiques propres, tels que les gènes de résistance auxquels ils sont le plus souvent associés, ainsi que les facteurs de virulence qui peuvent s'y adjoindre. Ici, nous nous intéressons particulièrement à sept complexes clonaux (CC258, CC147, CC307, CC101, CC15, CC37, CC20) qui ont diffusé dans le monde entier pour la plupart, et qui ont été trouvés dans des échantillons humains, environnementaux et animaux. Des études additionnelles sont nécessaires pour mieux appréhender la circulation de ces clones et leur capacité à acquérir des gènes de résistance.

Mots-clés : *Klebsiella pneumoniae*, clones épidémiques à haut risque, résistance aux antibiotiques, carbapénémases.