

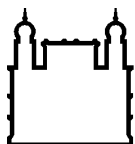
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RESISTÊNCIA AOS β -
LACTÂMICOS E TAXONOMIA DE ISOLADOS DO GÊNERO
KLEBSIELLA.

NILCÉIA DE VEIGA RAMOS

Rio de Janeiro
Março de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Nilcéia de Veiga Ramos

Caracterização genética da resistência aos β -lactâmicos e taxonomia de isolados do gênero *Klebsiella*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientadora: Prof. Dra. Ana Carolina Paulo Vicente

RIO DE JANEIRO

Março de 2014

ii

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

R175 Ramos, Nilcéia de Veiga

Caracterização da resistência aos β -lactâmicos e
taxonomia de isolados do gênero *Klebsiella* / Nilcéia de Veiga
Ramos. – Rio de Janeiro, 2014.

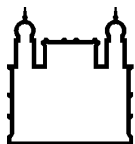
xv, 58 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Parasitária,
2014.

Bibliografia: f. 49-58

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. *Klebsiella variicola* SHV. 3.
LEN. 4. Taxonomia genômica. I. Título.

CDD 616.241



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: NILCÉIA DE VEIGA RAMOS

**Caracterização genética da resistência aos β -lactâmicos e taxonomia de
isolados do gênero *Klebsiella***

ORIENTADORA: Prof. Dra. Ana Carolina Paulo Vicente

Aprovada em: 12/03/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Verônica Viana Vieira - Presidente (FIOCRUZ)

Prof. Dr. Renata Cristina Picão (UFRJ)

Prof. Dr. Cristiane Carneiro Thompson (UFRJ)

Prof. Dr. Michel Abanto Marin (FIOCRUZ)

Prof. Dr. David Eduardo Barroso (FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 12 de março de 2014

Dedico esta dissertação à minha mãe,
que há tempos cumpre divinamente o
papel de pai e mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai (*in memoriam*) e minha mãe que sempre fizeram tudo por mim e que me ensinaram o valor dos estudos.

À minha orientadora Dra. Ana Carolina por todos os ensinamentos, paciência e por toda a atenção ao longo desses dois anos. Muito obrigada!!!!!!

À Dra. Verônica pela revisão desta dissertação e pelas ótimas contribuições para a melhoria do nosso trabalho.

À Érica Fonseca pela colaboração incondicional durante todos os momentos e pela amizade.

À Fernanda e Érica Miranda por todo o apoio com os experimentos e pela amizade.

Ao Diego, Michel e Bruno pelas dicas de bioinformática e apoio para este estudo.

A todo o pessoal do LGMM pela contribuição para a execução deste trabalho, obrigada!

À minha turma de mestrado da pós-graduação em Biologia Parasitária 2012 por todas as risadas e maravilhosos momentos que passamos juntos.

À Michelle e Diana pelo apoio e amizade. Amo vocês meninas!

Ao meu namorado Renato pelo amor, paciência e apoio durante todo este período.

To Derrick Fowler, my dearest friend, for all the support, friendship and laughter, all these years. You always believed in me and told me I would be fine and succeed. Thank you!

Aos membros da banca que aceitaram contribuir para este trabalho.

À minha família por todo o apoio durante todos esses anos.

A todos os meus amigos pelo incentivo e paciência.

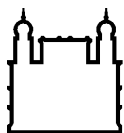
Ao Baby, Bidu, Billy, Amarelo, Eek, Gata Bela, Sharky, Lyssa, Anúbis, Athena e Odie, meus filhos de quatro patas, que foram fundamentais na escolha da minha profissão e que fazem todos os meus dias muito mais felizes.

À Coordenação da pós-graduação em Biologia Parasitária pela aprovação do nosso projeto e por tornar este trabalho possível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Instituto Oswaldo Cruz pelo auxílio financeiro.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” Arthur Schopenhauer

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.” Walter S. Landor



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

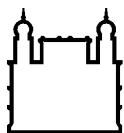
Caracterização da resistência aos β -lactâmicos e taxonomia de isolados do gênero *Klebsiella*.

RESUMO

Dissertação de Mestrado em Biologia Parasitária

Nilcéia de Veiga Ramos

O gênero *Klebsiella* compreende bactérias em forma de bastonete, gram-negativas e imóveis que pertencem à família Enterobacteriaceae. As espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*, patógenos oportunistas, são as mais importantes, sob o ponto de vista da clínica. Estas espécies têm sido relacionadas a um número crescente de infecções hospitalares multirresistentes. *K. pneumoniae* é classificada em três grupos filogenéticos: KpI, KpII e KpIII e os genes que codificam as β -lactamases de classe A cromossômicas SHV, OKP e LEN, estão relacionadas a estes grupos, respectivamente. Da mesma forma, o gene *bla*_{OXY} codifica a β -lactamase de classe A cromossômica que caracteriza a espécie *K. oxytoca*. *bla*_{SHV} é um gene cromossômico e plasmidial que codifica β -lactamases de espectro restrito (NSBLs) e estendido (ESBL). Até o momento, 183 alelos de *bla*_{SHV} foram identificados, mas o espectro de atividade de vários destes alelos ainda não foi determinado. As β -lactamases LEN são codificadas em cromossomos e são NSBLs. Recentemente a espécie *K. variicola* foi identificada. Esta espécie se caracteriza pela fixação de nitrogênio e nenhum gene constitutivo de β -lactamase foi associado à esta espécie. Este estudo objetivou determinar o espectro de resistência de alelos de *bla*_{SHV} identificados em *K. pneumoniae* e também identificar, em nível de espécie, isolados carreadores do gene *bla*_{LEN}. Por PCR e sequenciamento, alelos de *bla*_{SHV} e *bla*_{LEN} foram definidos comparando suas sequências com bancos de dados usando as ferramentas blastN e blastP. Estes genes foram clonados e expressos em sistema heterólogo, e o espectro de resistência dos transformantes foi avaliado. A taxonomia genômica dos isolados deste gênero foi realizada com base em sequências de genes recuperados de genomas de espécies de *Klebsiella* e aplicou-se as abordagens MLSA, rMLST e cgMLST. Identificamos *bla*_{SHV-28} (n=2), *bla*_{SHV-110} (n=1) e alelos novos de *bla*_{SHV} (n=3). Os transformantes para estes genes apresentaram resistência à amoxicilina, ampicilina e piperacilina, o que corresponde a um espectro restrito de resistência. Quanto a *bla*_{LEN}, foram identificados oito novos alelos em nove isolados. Dois deles eram idênticos aos encontrados no genoma de *K. variicola* AT-22 e todos estes alelos codificam NSBLs. A taxonomia genômica de *Klebsiella* definiu três grupos: *K. variicola*, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*. Curiosamente, alguns isolados de *K. pneumoniae* agruparam com o *K. variicola* AT-22, sugerindo pertencerem à esta espécie. Todos os isolados do grupo *K. variicola* albergavam o gene *bla*_{LEN} indicando que esta seria a β -lactamase constitutiva de *K. variicola*, e, por conseguinte, que o grupo KpIII é composto por isolados de *K. variicola*. Aqui nós determinamos que alelos de *bla*_{SHV} cromossômicos, incluindo *bla*_{SHV-28} e *bla*_{SHV-110}, previamente identificados como ESBLs, são NSBLs e concluímos que *K. variicola* pode estar sendo subestimada em infecções humanas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Characterization of the resistance to β -lactams and taxonomy of strains of the genus *Klebsiella*

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION in Biologia Parasitária

Nilcéia de Veiga Ramos

The genus *Klebsiella* comprises non-motile, gram-negative, rod-shaped bacteria, presenting a polysaccharide-based capsule, belonging to the Enterobacteriaceae family. The two most clinically important species from the genus are the opportunistic pathogens *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. These species have been related to an increasing number of multiresistant hospital-acquired infections. *K. pneumoniae* is classified into three phylogenetic groups: KpI, KpII and KpIII. Three chromosomal class A β -lactamase genes were recognized in *K. pneumoniae*: bla_{SHV} , bla_{OKP} and bla_{LEN} , which are related to KpI, KpII and KpIII groups, respectively. Similarly, the bla_{OXY} gene is the chromosomal class A β -lactamase that characterizes the *K. oxytoca* species. The bla_{SHV} is a chromosomal- and plasmid-borne gene encoding narrow (NSBLs) and extended spectrum β -lactamases (ESBLs). So far, 183 bla_{SHV} alleles were identified but the activity spectrum of dozen of alleles remain to be determined. LEN enzymes are chromosomal encoded with restrict activity against β -lactams and confers resistance only to penicillins. More recently, *K. variicola* species were identified and this species has the ability of fixing nitrogen. There are few studies concerning this species and no constitutive β -lactamase gene has been described in this species. This study aimed to determine the resistance spectrum of bla_{SHV} alleles identified in *K. pneumoniae* strains and also to identify, at species level, strains carrying bla_{LEN} chromosomal class A β -lactamase gene. PCR and sequencing were performed and bla_{SHV} , and bla_{LEN} alleles were determined by comparing their sequences with the database using blastN and blastP tools. These genes were cloned and expressed in a heterologous system, and the antibiotic resistance spectrum of the transformants was evaluated by susceptibility test. The genomic taxonomy of strains from this genus were performed based on genes from draft and complete genome sequences from *Klebsiella* species using MLSA, rMLST and cgMLST approaches. Strains harboring bla_{SHV-28} (n=2), $bla_{SHV-110}$ (n=1) and new bla_{SHV} alleles (n=3) were identified. All the transformants showed resistance to amoxicillin, ampicillin, piperacillin, ticarcillin, which correspond to a restricted spectrum of resistance. Concerning bla_{LEN} alleles, here were identified eight new alleles in nine strains. Two of them were identical to the one found in *K. variicola* AT-22 genome. The antibiotic resistance profile presented by the transformants indicated that all these bla_{LEN} alleles encode for NSBLs. The *Klebsiella* genomic taxonomy revealed three groups corresponding to *K. variicola*, *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* species. Curiously, some *K. pneumoniae* grouped with the *K. variicola* AT-22, suggesting that those strains, in fact, belong to *K. variicola* species and had been misidentified as *K. pneumoniae*. Moreover, it was observed that all strains from *K. variicola* cluster harbored the bla_{LEN} gene. This finding indicated that the bla_{LEN} gene is a constitutive *K. variicola* β -lactamase, and therefore, the KpIII group is composed by *K. variicola* strains. Here we determined that different chromosomal bla_{SHV} alleles, including bla_{SHV-28} e $bla_{SHV-110}$, previously labeled as ESBLs, and the new ones, are NSBLs. Also, we concluded that *K. variicola* can play an underestimated role in human infections.

ÍNDICE

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O gênero <i>Klebsiella</i>	1
1.1.1 A espécie <i>K. pneumoniae</i>	2
1.1.2 A espécie <i>K. oxytoca</i>	3
1.1.3 A espécie <i>K. variicola</i>	4
1.2 Genomas completos de <i>Klebsiella</i>	5
1.3 Fatores determinantes de resistência aos antimicrobianos	8
1.4 Mecanismos de resistência aos β-lactâmicos	10
1.4.1 β -lactamases.....	12
1.4.2 Genes de β -lactamases em <i>K. pneumoniae</i>	14
1.5 Taxonomia Polifásica	15
1.6 Taxonomia Genômica	16
1.7 Justificativa	17
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Meios de cultura e soluções	19
3.1.1 Meios de cultura.....	19
3.1.2 Soluções.....	19
3.2 Isolados bacterianos	20
3.3 Manutenção, estocagem e condições de cultivo dos isolados de <i>K. pneumoniae</i>	22
3.4 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos (Antibiograma)	22
3.5 Extração de DNA pelo método de choque térmico	23
3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	23
3.7 Eletroforese em gel de agarose	25
3.8 Caracterização do espectro de resistência conferido pelos genes <i>bla</i> através de clonagem em sistema heterólogo	25

3.9	Determinação das sequências nucleotídicas (Sequenciamento)	26
3.10	Análises computacionais.....	26
3.10.1	Análises <i>in silico</i> das β -lactamases de classe A de <i>Klebsiella</i> de isolados e genomas do banco de dados	26
3.10.2	Análises <i>in silico</i> dos genomas de <i>Klebsiella</i>	27
3.10.2.1	MLSA.....	27
3.10.2.2	rMLST.....	27
3.10.2.3	Análises filogenômicas por MLST utilizando o genoma <i>core</i> (cgMLST).....	27
4	RESULTADOS	29
4.1	Caracterização dos genes de β -lactamases de classe A cromossômicas nos isolados do gênero <i>Klebsiella</i>	29
4.2	Identificação dos alelos de <i>bla</i> _{SHV}	30
4.3	Determinação do perfil de susceptibilidade aos β -lactâmicos dos isolados carreadores dos distintos alelos de <i>bla</i> _{SHV}	33
4.4	Expressão de <i>bla</i> _{SHV} em sistema heterólogo	33
4.5	Identificação e caracterização da β -lactamase de classe A cromossômica de <i>K. variicola</i>	34
4.6	O gene <i>bla</i> _{LEN} e a resistência aos β -lactâmicos.....	38
4.7	Expressão de <i>bla</i> _{LEN} em sistema heterólogo	39
4.8	Taxonomia genômica das <i>Klebsiella</i>	40
4.8.1	MLSA	40
4.8.2	rMLST	41
4.8.3	cgMLST	42
4.8.4	MLSA dos isolados carreadores de <i>bla</i> _{LEN} de nosso estudo	43
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÕES	48
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - <i>Klebsiella pneumoniae</i> : Enterobactéria, bacilo gram negativo, ausência de flagelos.....	1
Figura 1.2 - Quatro tipos de mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos.....	9
Figura 1.3 - Esquema de hidrólise do antibiótico β -lactâmico por β -lactamase.....	14
Figura 4.1 - Comparação das sequências aminoacídicas de SHV.....	31
Figura 4.2 - Comparação dos alelos deste estudo com a SHV-1 (espectro restrito) e SHV-5 (espectro estendido). Em destaque G238S e E240K.....	32
Figura 4.3 - Perfil de susceptibilidade aos β -lactâmicos.....	33
Figura 4.4 - Perfil de susceptibilidade dos transformantes.....	34
Figura 4.5 - Comparação da sequência aminoacídica dos diferentes alelos da β -lactamase LEN.....	35
Figura 4.6 - Contexto genômico e gene de β -lactamase de classe A de <i>K. variicola</i> (em rosa hachurado) em genomas de <i>Klebsiella</i>	36
Figura 4.7 - Perfil de susceptibilidade aos β -lactâmicos dos isolados que carregam alelos do gene <i>bla</i> _{LEN}	39
Figura 4.8 - Perfil de susceptibilidade dos transformantes.....	39

Figura 4.9 - Árvore de MLSA de <i>Klebsiella</i>	41
Figura 4.10 - Árvore de rMLST de <i>Klebsiella</i>	42
Figura 4.11 - Árvore de cgMLST de <i>Klebsiella</i> (<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. variicola</i> e <i>K. oxytoca</i>).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Genomas completos de <i>Klebsiella</i> disponíveis no Genbank.....	7
Tabela 1.2 - Mecanismo de ação dos diversos antimicrobianos e mecanismos de resistência bacteriana.....	11
Tabela 1.3 - Esquemas de classificação de β -lactamases.....	13
Tabela 3.1 - Amostras de <i>Klebsiella</i> utilizadas neste estudo.....	21
Tabela 3.2 - Iniciadores utilizados nas reações de PCR e sequenciamento.....	24
Tabela 3.3 - Genomas de <i>Klebsiella</i> utilizados neste estudo.....	28
Tabela 4.1 - Diversidade de genes <i>bla</i> cromossômicos.....	29
Tabela 4.2 - Distribuição e espectro de atividade dos alelos de <i>bla</i> _{SHV}	30
Tabela 4.3 – Alelo de <i>bla</i> _{LEN} versus <i>Klebsiella</i>	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMC –	Amoxicilina com clavulanato
AMO –	Amoxicilina
AMP –	Ampicilina
ATM –	Aztreonam
CAZ –	Ceftazidima
CFL –	Cefalotina
CFO –	Cefoxina
CPM –	Cefepima
CRO –	Ceftriaxona
CTX –	Cefotaxima
ESBL –	β -lactamase de Espectro Estendido
K2P –	Kimura 2 parâmetros
LEN –	Nome do isolado de LEN-1.
Mb –	Mega bases
NSBL –	β -lactamase de Espectro Restrito
OKP –	Other <i>Klebsiella pneumoniae</i>
PBP –	Proteína Ligadora de Penicilina
PPT –	Piperacilina com tazobactam
PRL –	Piperacilina
SHV –	Sulfidril variável

1 INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Klebsiella*

O gênero *Klebsiella* pertence à família Enterobacteriaceae e inclui bactérias baciliformes gram-negativas, anaeróbicas facultativas, oxidase-negativas e desprovidas de flagelo. Estes organismos são caracterizados pela presença de uma cápsula polissacarídica proeminente que é responsável pela resistência das bactérias a diversos mecanismos de defesa do hospedeiro (Podschun e Ullmann, 1998).



Figura 1.1 - *Klebsiella pneumoniae*: Enterobactéria, bacilo gram negativo, ausência de flagelos.

<http://resistenciabacterianape.blogspot.com.br/2010/10/kpc-parte-i.html>

Bactérias do gênero *Klebsiella* podem ser encontradas no solo, água e plantas e são patógenos oportunistas para humanos e animais. (Podschun et al., 2001). Em plantas podem se estabelecer como endofíticas e atuam na fixação de nitrogênio (Riggs et al., 2001).

Enterobacteriaceae expressam tipicamente dois tipos de antígenos em sua superfície celular, um lipopolissacarídeo (antígeno O) e um polissacarídeo capsular (antígeno K), os quais contribuem para a sua patogenicidade. A variabilidade estrutural desses antígenos é a base para a classificação dos isolados em diferentes sorotipos (Turton et al., 2008).

As espécies do gênero *Klebsiella* foram originalmente estabelecidas com base em características fenotípicas e em função das doenças a que estavam associadas.

As novas bases da taxonomia microbiana, como a taxonomia polifásica e genômica, têm levado a revisões na classificação do gênero.

Este gênero inclui, atualmente, seis espécies: *K. pneumoniae* com suas três subespécies (*K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*), *K. oxytoca*, *K. variicola*, *K. granulomatis*, *K. singaporensis* e *K. michiganensis*. As espécies *K. planticola*, *K. terrigena* e *K. ornithinolytica* foram reclassificadas para o gênero *Raoultella* baseado na análise da sequência do gene *rpoB* (Rosenblueth et al., 2004, Wang et al., 2008).

A grande maioria dos testes automatizados não inclui muitas destas espécies nas suas bases de dados, nem os substratos que poderiam diferenciá-las (Westbrook et al., 2000). Além disso, na rotina da microbiologia clínica, as bactérias são identificadas frequentemente por métodos automatizados baseados em testes bioquímicos como sistemas Vitek e API. Devido à similaridade dos perfis bioquímicos encontrados nos isolados de um gênero, a identificação das espécies, muitas vezes é presuntiva (Gonçalves et al., 2002; Monnet e Freney, 1994).

Surtos epidêmicos relacionados a infecções pelo gênero *Klebsiella* tem sido frequentes nos últimos anos, atingindo, em especial, Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) e alas pediátricas de hospitais em todo o mundo. Cada vez mais esses surtos são causados por linhagens multirresistentes a antimicrobianos, o que dificulta o tratamento dos indivíduos afetados. (Romero et al., 2005).

1.1.1 A espécie *K. pneumoniae*

K. pneumoniae é a espécie mais representativa do gênero quanto a infecções em seres humanos. É saprófito da nasofaringe e do trato intestinal de humanos e mamíferos (Podschun e Ullmann, 1998).

Enterococcus faecium, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter* são os principais agentes etiológicos de infecções nosocomiais, mas também por representarem modelos de patogênese, transmissão e resistência, foram designados como pertencentes ao grupo ESKAPE (Rice, 2008).

Com base nas sequências dos alelos dos genes *gyrA*, *parC* e *rpoB* e das distâncias filogenéticas entre os mesmos, isolados clínicos de *K. pneumoniae* são classificados em três grupos filogenéticos denominados KpI, KpII e KpIII (Brisse e Verhoef, 2001). A grande maioria dos isolados clínicos pertence ao grupo KpI, que inclui todas as três subespécies de *K. pneumoniae*, enquanto que o grupo taxonômico KpII é representado apenas por isolados de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* e KpIII contém *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* e *Klebsiella variicola* (Brisse e Verhoef, 2001 e Rosenblueth et al., 2004).

Rosenblueth e colaboradores (2004) reportaram que a habilidade em fermentar adonitol também contribui para caracterização dos diferentes grupos, onde isolados do grupo KpI são adonitol-positivos enquanto que isolados do grupo KpIII são adonitol-negativos. Porém, Brisse e colaboradores (2004) reportaram mais tarde que KpI, KpII e KpIII podem variar quanto a capacidade de fermentação do adonitol, colocando em questão a fermentação do adonitol como teste fenotípico diferencial (Alves et al., 2006).

Cada grupo filogenético está associado a um gene constitutivo de β -lactamase de classe A. Isolados do grupo KpI carregam o gene *bla_{SHV}* e seus alelos, enquanto que os grupos KpII e KpIII carregam os genes *bla_{OKP}* e *bla_{LEN}*, respectivamente (Haeggman et al., 2004). Alelos do gene *bla_{SHV}* também são encontrados associados a plasmídeos em isolados de *Klebsiella* e outros gêneros de bactérias (Jacoby e Han 1996; Jain, 2003).

1.1.2 A espécie *K. oxytoca*

K. oxytoca é a segunda espécie mais comum identificada na clínica médica. É um microrganismo oportunista que pode causar infecções nosocomiais, pneumonias, infecções do trato urinário, septicemia e em alguns casos colite hemorrágica associada ao uso de antimicrobianos (Högenauer et al., 2006; Zollner-Schwetz et al., 2008; Liao et al., 2012).

K. oxytoca, assim como outras espécies do gênero, é naturalmente resistente às penicilinas, que correspondem à ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e piperacilina (Livermore, 1995). Este fenótipo de resistência é consequência da produção de β -lactamase de classe A constitutiva da espécie que é codificada pelo gene *bla_{OXY}*. Devido à hiperprodução da β -lactamase cromossômica OXY, de 10 a

20% dos isolados de *K. oxytoca* pode apresentar alta resistência ceftriaxona, cefotaxima e aztreonam (Fournier et al., 1994).

Cinco grupos filogenéticos de *K. oxytoca* são definidos a partir dos genes ribossomal 16S, *rpoB*, *gyrA*, *gapDH* e *bla_{oxy}*. Estes grupos correspondem a Kol, Koll, Kolll, KolV e KoVI (Fevre et al., 2005).

1.1.3 A espécie *K. variicola*

A espécie *K. variicola* foi descrita mais recentemente e isolados desta espécie encontram-se associados a plantas devido sua habilidade em participar da fixação de nitrogênio (Rosenblueth et al., 2004). No mesmo ano, Brisse e colaboradores sugerem que o grupo KpIII também conteria isolados da espécie *K. variicola* (Brisse et al., 2004). De acordo com Alves e colaboradores (2006), testes bioquímicos não são capazes de distinguir *K. pneumoniae* de *K. variicola* embora a análise das sequências de *rpoB* seja discriminativa, obtendo-se 98 a 100% de similaridade de sequências de *rpoB* para isolados de *K. pneumoniae* conhecidos e 99 a 100% de similaridade de sequências comparando-se isolados de *K. variicola*, incluindo a amostra-tipo ATCC BAA-830. Portanto, possivelmente, um percentual de isolados classificados como *K. pneumoniae* na realidade possam ser *K. variicola* já que, só quando se aplica taxonomia polifásica estas duas espécies são diferenciadas. Estes dados demonstram a complexidade taxonômica e a dificuldade em definir espécies do gênero com bases bioquímicas. Este cenário será abordado no presente estudo.

Em 2006, foi descrita a primeira ocorrência de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) na espécie *K. variicola*. No estudo, três isolados obtidos a partir de amostras clínicas de um hospital universitário brasileiro apresentaram resistência quanto às oximino-cefalosporinas, que correspondem às cefalosporinas de terceira e quarta geração (Alves et al., 2006). Até o momento, nenhuma β -lactamase constitutiva foi descrita em *K. variicola*, e esta questão será abordada neste estudo.

Seki e colaboradores (2013) descreveram um caso fatal de sepse causada por *K. variicola*, inicialmente identificada como *K. pneumoniae* por um sistema automatizado de identificação. O isolado não apresentava o fenótipo mucoide normalmente associado à virulência de *K. pneumoniae*. Estudo *in silico*, utilizando o genoma completo de *K. variicola* At-22, mostrou a presença de um *locus* associado

ao sistema de secreção do tipo VI, que poderia estar envolvido na patogênese desta bactéria (Sarris et al., 2011).

1.2 Genomas completos de *Klebsiella*

Apenas as espécies *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *K. variicola* possuem genomas completos disponíveis no Genbank. Até janeiro de 2014, havia treze genomas completos depositados. Considerando a espécie *K. pneumoniae*, cinco genomas pertencem à subespécie *K. pneumoniae pneumoniae*, um à subespécie *K. pneumoniae rhinoscleromATis* e os outros quatro não tem a subespécie definida. A maioria destes isolados é de origem clínica.

O genoma *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* MGH 78578 foi o primeiro genoma da espécie completamente sequenciado e disponibilizado (2006). Trata-se de um isolado clínico de 1994, obtido de escarro de paciente. O sequenciamento revelou que o conteúdo genômico desta amostra estava distribuído em um único cromossoma circular de aproximadamente 5.69 Mega bases (Mb) com conteúdo GC de 57.2% e em cinco plasmídeos (Número de acesso Genbank: NC_009648.1).

Em 2008, o genoma *K. pneumoniae* 342 foi obtido a partir da bactéria mutualística, fixadora de nitrogênio e endofítica de plantas de milho (Fouts et al., 2008). A identificação da espécie se baseou na identidade da sequência da subunidade do 16S e testes fenotípicos (Chelius e Triplett, 2000). Este genoma é composto por um cromossomo circular de 5,64 Mb (conteúdo GC 57,9%) e por dois plasmídeos (Fouts et al., 2008). Em nosso estudo vamos demonstrar que este isolado, assim como outros, classificado como *K. pneumoniae*, não pertencem a esta espécie, mas sim à espécie *K. variicola*.

Até agora, mesmo com vários genomas de *K. pneumoniae* disponibilizados, ainda não está definido o genoma *core* e o pangenoma desta espécie. De um modo geral, as informações genômicas mostram que se trata de uma espécie que apresenta um mobiloma rico e diverso já que, nos organismos sequenciados, disponíveis no Genbank, foram identificados 79 diferentes plasmídeos, assim como profagos e ilhas genômicas.

O único genoma completo disponível de *K. variicola* At-22 foi obtido a partir de isolado de fungos de colônia de formigas cortadeiras prevalentes em diversos sítios

da América Central que atuam como simbioses na fixação de nitrogênio. O genoma completo deste isolado da espécie possui 5.46 Mb, conteúdo GC de 57.6% e nenhum plasmídeo. (Pinto-Tomás et al., 2009).

O primeiro genoma completamente sequenciado de *K. oxytoca* foi publicado em 2012 (Liao et al., 2012). O isolado foi obtido a partir de uma amostra clínica em Taiwan que carregava o gene *bla_{NDM-1}* (New Delhi Metallo- β -Lactamase). (Lai et al, 2011). Este genoma é composto por um cromossomo circular de 6,09 Mb, o maior entre os genomas das espécies de *Klebsiella*, conteúdo GC de 56,4% e dois plasmídeos, um deles carregando o gene *bla_{NDM-1}* (Liao et al., 2012).

Tabela 1.1 - Genomas completos de *Klebsiella* disponíveis no *Genbank*

Genomas completos de <i>Klebsiella</i>							
Organismo	Origem	Cromossomos	Plasmídios	Tamanho (Mb)	GC%	Genes	Proteínas
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> HS11286	Clínica	1	6	5,68	57,1	5,867	5,779
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578	Clínica	1	5	5,69	57,2	5,304	5,184
<i>K. pneumoniae</i> 342	Ambiental	1	2	5,92	56,9	5,934	5,766
<i>K. pneumoniae</i> CG43	Clínica	1	–	5,17	57,6	4,940	4,791
<i>K. pneumoniae</i> JM45	Clínica	1	2	5,6	57,2	5,249	5,141
<i>K. pneumoniae</i> KCTC 2242	ND	1	1	5,46	57,3	5,264	5,152
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 1084	Clínica	1	–	5,39	57,4	5,069	4,962
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> NTUH-K2044	Clínica	1	1	5,47	57,4	5,386	5,262
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> SB3432	Clínica	1	1	5,38	57,1	5,913	5,265
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> Kp13	Clínica	1	6	5,74	56,8	5,868	5,736
<i>K. variicola</i> AT-22	Ambiental	1	–	5,46	57,6	5,213	5,057
<i>K. oxytoca</i> E718	Clínica	1	2	6,56	55,5	6,170	6,023
<i>K. oxytoca</i> KCTC 1686	ND	1	–	5,97	56	5,598	5,488

ND= não disponível

1.3 Fatores determinantes de resistência aos antimicrobianos

A resistência bacteriana aos antimicrobianos pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é natural do organismo. É o que ocorre, por exemplo, com a espécie *K. pneumoniae*, que é naturalmente resistente à ampicilina devido a presença do gene cromossômico *bla_{SHV}* que codifica um β -lactamase de classe A que hidrolisa penicilinas. A resistência adquirida ocorre quando alguns isolados da espécie sofrem alterações no seu conteúdo gênico. Este evento pode ocorrer por mutações ou por aquisição de DNA exógeno (Hawkey, 1998).

As mutações levam à resistência por (1) alteração na proteína alvo ao qual se liga o antimicrobiano ao modificar ou eliminar o local de ligação, (2) vias de escape, (3) hiporegulação ou alteração de proteína de membrana externa e/ou (4) hiper-regulação de bombas de efluxo que ejetam a droga da célula bacteriana (Ogawa et al., 2005) (Figura 1.2).

Sistemas de bombas de efluxo a múltiplas drogas, na maioria das vezes, conferem resistência de natureza adquirida e são amplamente distribuídos em bactérias gram negativas. Estes sistemas tem grande importância na resistência intrínseca (Poole, 2002).

Quanto à emergência de resistência por transferência lateral de genes, a aquisição de genes pode ocorrer via: transdução, conjugação e transformação e muitas vezes envolve transposons que carregam e incorporam genes codificadores de enzimas modificadoras/ligantes/hidrolíticas de antimicrobianos ao genoma da bactéria hospedeira.

Integrans são elementos genéticos associados à aquisição de genes de resistência pelas bactérias. São elementos de captura e expressão de genes (cassetes gênicos) (Hall e Collins, 1995). Os integrans de resistência pertencem às classes 1, 2 e 3. Integrans de classe 1 são os mais disseminados em isolados provenientes de amostras clínicas, e a maioria dos cassetes gênicos presentes neste elemento está relacionada à resistência aos antimicrobianos. Estas três classes de integrans estão fisicamente associadas a elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons, que atuam como veículos na disseminação dos integrans nas espécies e entre espécies (Mazel, 2006).

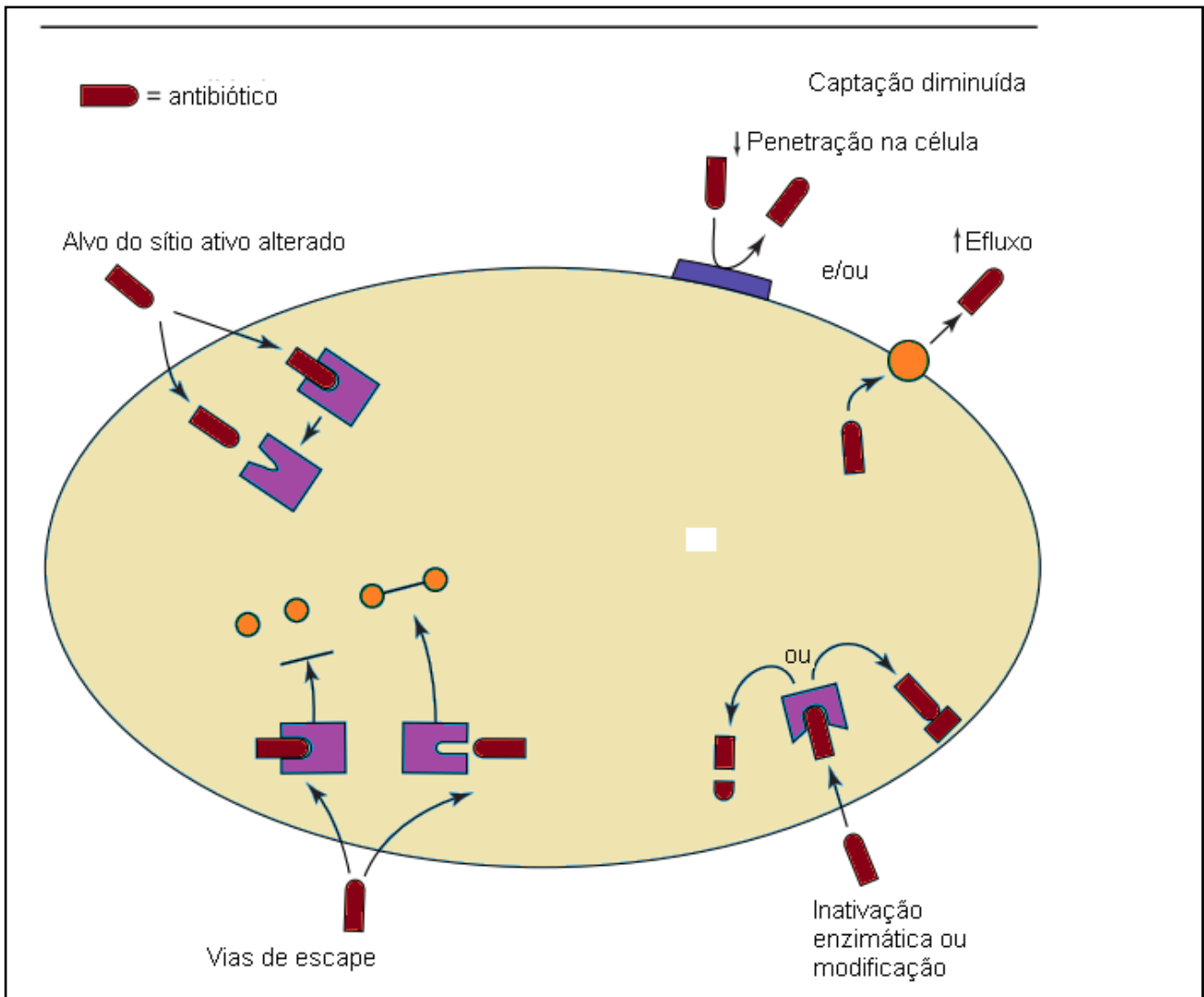


Figura 1.2 – Quatro tipos de mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos
(Adaptado de Hawkey, 1998)

1.4 Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos

Na clínica médica são utilizados diversas classes de antimicrobianos. Os β -lactâmicos, que compreendem as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas, apresenta o anel β -lactâmico como característica estrutural comum destas classes.

Os principais mecanismos que levam à resistência aos β -lactâmicos são: (1) produção de β -lactamases, que é o mecanismo mais prevalente em bactérias gram negativas (Draws e Bonomo, 2010); (2) mudanças no sítio ativo de proteínas ligadoras de penicilinas ou PBPs, que podem diminuir ou abolir a afinidade do β -lactâmico pelo seu alvo (Laible, Spratt e Hakenbeck, 1991); (3) diminuição na expressão de proteínas externas de membrana, as OMPs; e (4) bombas de efluxo, capazes de exportar substratos do periplasma para o ambiente externo (Poole, 2004) (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 - Mecanismo de ação dos diversos antimicrobianos e mecanismos de resistência bacteriana

Droga	Alvo bacteriano	Mecanismo de resistência
β -lactâmicos	Síntese de parede bacteriana	β -lactamases, alteração de Proteínas ligadoras de penicilinas, barreira de permeabilidade, bombas de efluxo ativas
Aminoglicosídeos	Síntese de proteína (inibidor da subunidade ribossomal 30S)	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (ANT, APH, AAC), alteração de ribossomos, barreira de permeabilidade, bombas de efluxo ativas
Peptídeos catiônicos	Membrana celular	Alterações no alvo, bombas de efluxo ativas
Cumarínicos	Síntese de DNA (DNA girase B)	Alterações no alvo, bombas de efluxo ativas
Cloranfenicol	Síntese de proteína (inibidor da subunidade ribossomal 50S)	Acetiltransferase, bombas de efluxo ativas
Isoniazida	Síntese de ácidos graxos	Perda da ativação do antimicrobiano, alteração no alvo
Glicopeptídeos	Síntese de proteína (inibidor da subunidade ribossomal 50S)	Alteração no alvo
Macrolídeos	Síntese de proteína (inibidor da subunidade ribossomal 50S)	Alteração no alvo, bombas de efluxo ativas
Oxazolidinonas	Síntese de proteína (inibidor da subunidade ribossomal 50S)	Alteração no alvo, bombas de efluxo ativas
Polimixinas	Membrana celular	Alteração em lipopolissacarídeos
Quinolonas	Síntese de DNA (DNA girase e topoisomerase IV)	Alteração na DNA girase e topoisomerase IV, bombas de efluxo ativas
Rifamicinas	Síntese de RNA (RNA polimerase DNA-dependente)	Alteração da subunidade β da RNA polimerase, bombas de efluxo ativas
Streptograminas	Síntese de proteína (inibidor da subunidade ribossomal 50S)	Alteração no alvo
Sulfonamidas	Alteração na síntese de ácido fólico	Alteração no alvo, escape do alvo, bombas de efluxo ativas
Tetraciclinas	Síntese de proteína (inibidor da subunidade ribossomal 30S)	Bombas de efluxo ativas, alteração ribossomal, alteração na droga
Trimetoprim	Alteração na síntese de ácido fólico	Escape do alvo, bombas de efluxo ativas

(Adaptado de Li e Nikaido 2009)

1.4.1 β -lactamases

As β -lactamases são enzimas que hidrolisam antimicrobianos β -lactâmicos. (Figura 1.3). Estas enzimas são classificadas de acordo com dois esquemas gerais: a classificação de Ambler (Ambler, 1980) com bases na sequência proteica, e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush, Jacoby e Medeiros, 2009). A classificação de Ambler divide as β -lactamases em quatro classes principais (A a D), e se baseia na similaridade das sequências de aminoácidos. As β -lactamases de classes A, C e D são serina- β -lactamases, enquanto que as de classe B são metalo- β -lactamases. A classificação de Bush-Jacoby agrupa as β -lactamases de acordo com as similaridades funcionais das enzimas, ou seja, o perfil dos substratos e dos inibidores. De acordo com essa classificação, existem quatro grupos principais e múltiplos subgrupos. Este esquema de classificação tem maior relevância na clínica, já que este considera os inibidores das β -lactamases e os β -lactâmicos substratos destas enzimas clinicamente relevantes (Tabela 1.3).

Cada classe de β -lactamases contém assinaturas específicas ou motivos. O motivo que caracteriza a classe A contém três elementos conservados: S-X-X-K, S-D-N e K-T-G nas posições 70, 130 e 234, respectivamente, segundo a classificação de Ambler. Os motivos que caracterizam a classe C são: S-X-S-K, Y-S-N, e K-T-G nas posições 64, 150 e 314, respectivamente. A classe D contém S-X-X-K, Y-G-N e K-T-G nas posições 70, 144 e 214 respectivamente. As enzimas pertencentes à classe B contém H-90, D-92, L-117, H-168, G-204 e H-236 como resíduos conservados localizados em seu sítio ativo. Entre esses H-80, H-90 e H-168 acomodam Zn^{2+} , que é necessário para a atividade da β -lactamase de classe B, ou as Metalo- β -lactamase (Matagne, Lamotte-Brasseur e Freare, 1998).

Em relação à funcionalidade (esquema de Bush-Jacoby-Medeiros), as β -lactamases de classe A podem ser dos grupos 2b, 2be e 2br, que estão relacionados ao espectro restrito de ação aos β -lactâmicos, espectro estendido e resistência aos inibidores de β -lactamases, respectivamente. Por exemplo, o alelo das enzimas TEM-1 e SHV-1, grupo funcional 2b, hidrolisam penicilinas, ampicilina, carbenicilina e cefalotina (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995). Por sua vez, outros alelos destas mesmas enzimas têm espectro estendido de ação e hidrolisam também cefalosporinas de terceira e quarta geração (oximino-cefalosporinas), não hidrolisam cefamicinas nem carbapenemas e são inibidas por inibidores de β -lactamases, são, portanto, ESBLs (grupo funcional 2be).

Tabela 1.3 – Esquema de classificação de β -lactamaes (Adaptado de Bush e Jacoby, 2009)

Bush-Jacoby (2009)	Ambler	Substrato	Inibido por Ác. Clavulânico ou tazobactam	Características funcionais	β -lactamases representativas
1	C	Cefalosporinas	Não	Maior hidrólise de cefalosporinas do que benzilpenicilinas; hidrólise de cefamicinas	AmpC de E. Coli, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cefalosporinas	Não	Aumento da hidrólise de ceftazidima e frequentemente outras oximino- β -lactâmicos	GCI, CMY-37
2 ^a	A	Penicilinas	Sim	Maior hidrólise de benzilpenicilinas do que cefalosporinas;	PCI
2b	A	Penicilinas e cefalosporinas de espectro restrito	Sim	Benzilpenicilinas e cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de amplo espectro, monobactâmicos	Sim	Aumento da hidrólise de oximino- β -lactâmicos	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas	Não	Resistência ao ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de amplo espectro, monobactâmicos	Não	Aumento da hidrólise de oximino- β -lactâmicos combinado com a Resistência ao ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-50
2c	A	Carbenicilina	Sim	Aumento da hidrólise de carbenicilina	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilina, cefepime	Sim	Aumento da hidrólise de carbenicilina, cefepime e ceftazidima	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variável	Aumento da hidrólise de cloxacilina ou oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de amplo espectro	Variável	Hidrólise de cloxacilina ou oxacilina e oximino- β -lactâmicos	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenemas	Variável	Hidrólise de cloxacilina ou oxacilina e carbapenemas	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de amplo espectro	Sim	Hidrólise de cefalosporinas. Inibida por ácido clavulânico mas não aztreonam	CepA
2f	A	Carbapenemas	Variável	Aumento da hidrólise de carbapenemas, oximino- β -lactâmicos, cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3 ^a	B (B1)	Carbapenemas	Não	Hidrólise de espectro restrito incluindo carbapenemas mas não monobactâmicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
	B (B3)				L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (B2)	Carbapenemas	Não	Hidrólise preferencial de carbapenemas	CphA, Sfh-1

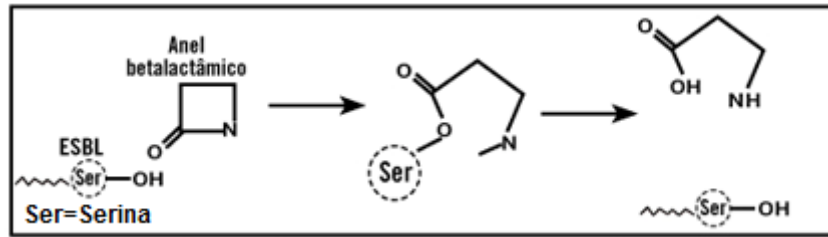


Figura 1.3 - Esquema de hidrólise do antibiótico β -lactâmico por β -lactamase. (Adaptado de Livermore, 1995)

1.4.2 Genes de β -lactamases em *K. pneumoniae*

A resistência enzimática aos antimicrobianos conferida pelas β -lactamases é um dos mecanismos mais amplamente distribuído entre as bactérias de impacto clínico. Genes de β -lactamases são constitutivos de várias espécies de bactérias, mas alelos destes genes têm se espalhado entre espécies e gêneros por transferência lateral, principalmente via plasmídeos.

O conhecimento da diversidade e evolução dos genes de resistência a antimicrobianos em populações naturais é importante para o entendimento da origem da resistência e da evolução e atividade desses genes (Barlow e Hall, 2002). Dessa forma, essas diferentes variantes de β -lactamases de classe A podem ser usadas como marcadores genéticos.

Aqui vamos nos ater aos genes codificadores de β -lactamases de classe A constitutivos de *K. pneumoniae*, que são: *bla*_{SHV}, *bla*_{OKP} e *bla*_{LEN}.

O gene *bla*_{SHV} é constitutivo da espécie *K. pneumoniae* (Babini e Livermore, 2000). Dentre os alelos deste gene encontram-se alelos de espectro restrito e estendido.

Até janeiro de 2014, 183 alelos haviam sido identificados segundo www.lahey.org/studies/webt.htm. Destes, 44 alelos estão relacionados a fenótipo de resistência aos β -lactâmicos definido como β -lactamase de espectro estendido (grupo funcional 2be), 37 alelos de *bla*_{SHV} codificariam β -lactamases de espectro restrito (grupo funcional 2b) de resistência e 7 apresentam resistência aos inibidores de β -lactamases (grupo funcional 2br). Portanto, 95 alelos descritos, com base em substituições na sequência de aminoácidos, ainda não foram determinados experimentalmente quanto ao seu espectro de ação, como por exemplo, o *bla*_{SHV-28} e *bla*_{SHV-110}.

Já se sabe que uma das modificações envolvidas na conversão de uma SHV-não NSBL (narrow spectrum β -lactamase, ou espectro restrito) em uma SHV-ESBL é a substituição aminoacídica de uma glicina por uma serina na posição 238 (G238S). A extensão do espectro e aumento de atividade da enzima pode também ser conferida pela substituição aminoacídica de um glutamato por uma lisina na posição 240 (E240K) (Jacoby, 1994; Hammond et al., 2005).

A espécie *K. pneumoniae* pode carrear diferentes genes de β -lactamases de classe A cromossômicas além do *bla*_{SHV}. As famílias LEN (Arakawa et al., 1986) e OKP (Haegmann et al., 2004) se distinguem entre si e da família SHV com base nas diferenças nucleotídicas e nas características físico-químicas das enzimas que os respectivos genes codificam. O gene *bla*_{OKP} é o mais divergente em relação ao *bla*_{SHV} (88% de identidade) e *bla*_{LEN} (91% de similaridade). Assim como observado nos *bla*_{SHV}, vários alelos de *bla*_{LEN} e *bla*_{OKP} já foram identificados, embora nenhum alelo de *bla*_{LEN} e *bla*_{OKP} produtor de ESBLs tenha sido descrito. Além disso, apenas alelos da família *bla*_{SHV} já foram encontrados fora do contexto cromossômico, em associação com plasmídeos e transposons (Siebor et al., 2005, Mendonça e Ferreira, 2009). Essas três famílias compartilham o mesmo espectro restrito de resistência a antimicrobianos, ou seja, isolados que carregam os genes *bla*_{LEN} ou *bla*_{OKP} são intrinsecamente resistentes às penicilinas e seus derivados (Haegmann et al., 2004).

Segundo Brisse e Verhoef (2001), a espécie *K. pneumoniae* pode ser dividida em três grupos filogenéticos que estão distribuídos mundialmente e podem ser classificados de acordo com a β -lactamase intrínseca que carregam. Estes grupos correspondem a KpI, KpII e KpIII. Mais de 80% dos isolados pertence ao grupo KpI, que está relacionado a enzima SHV. Os grupos KpII e KpIII correspondem a OKP e LEN respectivamente (Brisse e Verhoef, 2001; Hæggman et al., 2004). Em 2004, Brisse e colaboradores reportaram que isolados da espécie *K. variicola* também estaria incluída no grupo KpIII.

1.5 Taxonomia Polifásica

A abordagem polifásica de bactérias inclui o uso de dados fenotípicos, quimiotaxonômicos e genotípicos. O uso de sequências do gene ribossomal 16S revolucionou a nossa compreensão do mundo microbiano e levou a um rápido aumento no número de descrições de novos táxons, especialmente em nível de espécie (Chun e

Rainey, 2014). Neste processo, a caracterização genotípica é um componente essencial na descrição de espécies, como a informação genética revela as relações evolutivas entre as diversas linhagens. A análise filogenética baseada em sequências de genes 16S rRNA e a determinação de similaridade entre as sequências são agora rotineiramente realizadas na identificação de novos organismos (Stackebrandt e Ebers, 2006; Stackebrandt e Goebel, 1994; Tindall et al., 2010).

1.6 Taxonomia Genômica

A taxonomia tradicional que é baseada nos caracteres morfológicos e/ou bioquímicos das bactérias apresenta limitações consideráveis que vão da subjetividade inerente à escolha dos caracteres taxonômicos a serem empregados, até a acessibilidade das informações produzidas. Entre as principais limitações existentes, podem ser citadas a plasticidade e volatilidade de muitos caracteres fenotípicos, as chaves morfológicas ciclo-dependentes, a bioquímica bacteriana estar, principalmente, baseada nos organismos de importância médica, e a dependência do cultivo da bactéria. Em plena era da genômica e da computação, passamos a ter o conhecimento e a tecnologia necessários para a implementação e universalização da taxonomia genômica.

A taxonomia microbiana vem sofrendo uma tremenda revolução com o advento de técnicas rápidas de sequenciamento de genomas microbianos completos e com o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática que auxiliam na extração de informação taxonômica a partir das sequências de genomas (Coenye et al., 2005; Gevers et al., 2005; Konstantinidis e Tiedje, 2005).

A taxonomia genômica é baseada na comparação de genomas completos que inclui a análise de dados de MLSA (Análise de Sequências de Múltiplos *loci*) e outras análises e assim estabelece a identificação e a classificação microbiana com base na informação taxonômica e filogenética disponível.

Uma das variações do MLSA, com aplicações taxonômicas, é o rMLST (Sequência Tipo de Múltiplos *loci* ribossomais) que utiliza 53 genes codificadores de subunidades de proteínas ribossomais. As subunidades proteicas ribossomais são alvos robustos para a taxonomia genômica, pois (1) estão presentes em todas as bactérias; (2) estão distribuídas por todo o cromossomo; e (3) codificam proteínas que estão sob seleção estabilizada para conservação funcional do organismo. O rMLST é mais informativo que

os genes ribossomais 16S ou 23S, sendo resolutivo para os níveis do domínio (Jolley et al., 2012).

Na realidade, a informação, a priori, a ser utilizada na taxonomia genômica, seria todo o conjunto de genes ortólogos dos organismos no nível do domínio que está sendo analisado.

Portanto, baseado na genômica, isolados de uma mesma espécie compartilham 95% ou mais de Identidade Aminoacídica Média, e Identidade de Nucleotídica Média, 95% ou mais de identidade baseada em alinhamentos múltiplos de genes, abaixo de 10 na assinatura genômica de Karlin e acima de 70% de similaridade da hibridização genoma-genoma. (Thompson et al, 2014).

1.7 Justificativa

Em um estudo, utilizando a abordagem de MLST aplicada a um conjunto de isolados clínicos e ambientais identificados, com base no fenótipo, como *Klebsiella pneumoniae*, foram caracterizados três grupos principais: um com identidade com *K. pneumoniae*; outro com identidade com a *K. variicola* e um terceiro. Além da análise anterior estes isolados foram também caracterizados quanto à resistência aos antimicrobianos. Em relação à resistência às penicilinas, que em *Klebsiella* pode estar associada aos genes cromossomais *bla*_{SHV}, *bla*_{OKP} e *bla*_{LEN}, foram observados vários perfis de resistência que podem estar relacionados aos distintos alelos destes genes e/ou outros determinantes genéticos. Muitos dos alelos do *bla*_{SHV} têm seu espectro de ação definido, que pode ser restrito ou estendido, mas muitos ainda precisam ser caracterizados, principalmente, os alelos de genes cromossômicos, já que estes caracterizam linhagens. Sendo assim, nossos objetivos foram:

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização genética da resistência aos β -lactâmicos e descrever a taxonomia de isolados do gênero *Klebsiella*.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os genes de β -lactamases de classe A cromossômicas em *Klebsiella*;
- Determinar o espectro de resistência que os alelos *bla*_{SHV-28}, *bla*_{SHV-110}, *bla*_{SHV-novos} e *bla*_{LEN} conferem.
- Aplicar a taxonomia genômica à *Klebsiella*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura e soluções

A esterilização de todos os meios de cultura foi realizada em autoclave a 120°C, um (1) atm, por 20 minutos.

3.1.1 Meios de cultura

- **BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid)** – infusão de sólidos de cérebro de bezerro (12,5g); infusão de sólidos de coração de boi (5g); proteose peptona (10g); glicose (2g); cloreto de sódio (5g); fosfato de sódio dibásico (2,5g), pH 7,2 – 7,6. Os compostos foram dissolvidos em 1 litro de água destilada. Para o preparo de meio sólido, adicionou-se 1,2% de ágar bacteriológico (Oxoid).
- **Ágar Mueller Hinton (Difco)** - infusão de carne (300g); casaminoácidos (17,5g); amido (1,5g); ágar (17g). Os compostos foram dissolvidos em 1 litro de água destilada e a suspensão foi aquecida até a dissolução completa do ágar.
- **Ágar Luria Bertani – LB (SIGMA)** - Cloreto de sódio (10g); Extrato de levedura (5g); Triptona (caseína Peptona) (10g); Ágar (15g). Os compostos foram dissolvidos em 1 litro de água destilada e a suspensão foi aquecida até a dissolução completa do ágar.

3.1.2 Soluções

- **TAE 50X (Tris-acetato-EDTA) (Eppendorf)** – Tris-Acetato 2M; EDTA 0,05M, pH 8,3.
- **Salina 0,85% (p/v)** – 0,85g de cloreto de sódio em 100mL de água destilada. Auto clavado a 120°C por 20 minutos.

3.2 Isolados bacterianos

Os isolados de *Klebsiella* utilizados neste estudo pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, que é composta de 123 isolados clínicos e ambientais. Destes, 43 foram analisados neste estudo. Os isolados são provenientes do Rio de Janeiro (RJ), Amazonas (AM), Maranhão (MA), Acre (AC) e Pará (PA) e foram recuperados no período de maio de 2000 a setembro de 2013. Estes isolados foram previamente identificados nos serviços que os isolaram como *K. pneumoniae* e *Klebsiella* sp. através de testes bioquímicos usando os sistemas API e VITEK (BioMerieux). O critério de seleção inicialmente aplicado foi o fenótipo de resistência aos β -lactâmicos utilizados na prática clínica apresentado pelos isolados.

Tabela 3.1 – Amostras de *Klebsiella* utilizadas neste estudo

Isolado	Origem	Fonte	Ano
K 226	Acre	Clínico	N/D
K 235	Acre	Clínico	N/D
K 431	Acre	Clínico	N/D
K 13	Amazonas	Ambiental	N/D
K 81	Amazonas	Ambiental	2006
K 83	Amazonas	Ambiental	2006
K 87	Amazonas	Clínico	N/D
K 88	Amazonas	Clínico	N/D
K 89	Amazonas	Clínico	2006
K 90	Amazonas	Clínico	N/D
K 74	Maranhão	Clínico	2006
K 77	Maranhão	Clínico	2006
K 106	Maranhão	Clínico	2012
K 107	Maranhão	Clínico	2012
K 108	Maranhão	Clínico	2012
K 109	Maranhão	Clínico	2012
K 110	Maranhão	Clínico	2012
K 111	Maranhão	Clínico	2012
K 112	Maranhão	Clínico	2012
K113	Maranhão	Clínico	2012
K 114	Maranhão	Clínico	2012
K 020	Pará	Ambiental	N/D
K 16	Rio de Janeiro	Clínico	2005
K 17	Rio de Janeiro	Clínico	2005
K 18	Rio de Janeiro	Clínico	2005
K 21	Rio de Janeiro	Clínico	2005
K 26	Rio de Janeiro	Clínico	2005
K 33	Rio de Janeiro	Clínico	2005
K 100	Rio de Janeiro	Clínico	2011
K 101	Rio de Janeiro	Clínico	2011
K 102	Rio de Janeiro	Clínico	2011
K 103	Rio de Janeiro	Clínico	2011
K 104	Rio de Janeiro	Clínico	2012
K 105	Rio de Janeiro	Clínico	2012
K 115	Rio de Janeiro	Clínico	2012
K 116	Rio de Janeiro	Clínico	2012
K 117	Rio de Janeiro	Clínico	2012
K 118	Rio de Janeiro	Clínico	2012
K 19	Rio de Janeiro	Clínico	2005
K 22	Rio de Janeiro	Clínico	2005
K 52	Rio de Janeiro	Clínico	2005
K 57	Rio de Janeiro	Clínico	2005
K 95	Rio de Janeiro	Clínico	2010

3.3 Manutenção, estocagem e condições de cultivo dos isolados de *K. pneumoniae*

Os estoques bacterianos foram feitos a partir de colônias puras crescidas em placa BHI a 37°C por 12-18 horas. Após o crescimento, as colônias obtidas foram diretamente estocadas em meio BHI líquido acrescido de glicerol 20% a uma temperatura de -20°C e -80°C. Concomitantemente, essas colônias também foram repicadas em 3 mL de meio BHI líquido e crescidas a 37°C com agitação constante de 200 oscilações por minuto por 12-18 horas. Elas foram então repicadas para tubos contendo BHI sólido inclinado e incubadas a 37°C por 24 horas. Após observação de crescimento, essas culturas foram cobertas com óleo mineral previamente esterilizado e mantidas a temperatura ambiente por até seis meses. Para obtenção de massa bacteriana para os experimentos, foram feitos repiques a partir do estoque para tubos contendo de 3-5mL de meio BHI líquido e incubados a 37°C por 12-18 horas com agitação.

3.4 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos (Antibiograma)

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinada pelo método de difusão de discos em placas contendo ágar Mueller-Hinton, de acordo com as recomendações do CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2014). Uma colônia obtida em placa com meio BHI foi resuspensa em solução salina 0,85% estéril e a densidade óptica ajustada de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland. A suspensão obtida foi inoculada com o auxílio de *swab* estéril sobre uma placa de ágar Mueller-Hinton. Após alguns minutos, foram aplicados discos impregnados com antimicrobianos (Oxoid, Basingstoke, UK). A cultura foi incubada a 37°C por 18 horas. Os halos de inibição de crescimento bacteriano foram medidos com régua milimétrica e os isolados foram classificados como sensíveis ou resistentes baseando-se nos tamanhos dos diâmetros observados em comparação com os apresentados na tabela do CLSI (2014). Os isolados foram testados para os seguintes antimicrobianos: amoxicilina, amoxicilina/clavulanato, ampicilina, aztreonam, cefalotina, cefepima, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona, piperacilina, piperacilina/tazobactam. Quando a resistência envolve três ou mais classes de antimicrobianos, as bactérias são consideradas multirresistentes (MDR) (D'Agata, 2004).

3.5 Extração de DNA pelo método de choque térmico

Os isolados bacterianos foram inoculados em tubos contendo 3mL de caldo BHI e incubados a 37°C por 12-18 horas com agitação. 1mL de cultura de cada amostra foi transferido para um microtubo e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi resuspenso em 500µL de salina 0,85% e centrifugado novamente a 3000 RPM por 5 minutos. Essa operação foi repetida mais uma vez. Por fim, o sedimento foi resuspenso em água milli-Q esterilizada e esta suspensão foi submetida a banho-maria fervente (100°C) por 10 minutos, sendo imediatamente submetida a uma temperatura de -20°C. Este material foi posteriormente descongelado à temperatura ambiente e centrifugado rapidamente (14.000 RPM por 15 segundos) e o sobrenadante utilizado nas reações de PCR.

3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os iniciadores utilizados na reação de PCR estão indicados na Tabela 3.1. Os iniciadores desenvolvidos em nosso laboratório foram definidos com a ajuda do programa PRIMER3 disponível online (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Koressaar e Remm, 2007; Untergrasser et al., 2012). Os demais iniciadores foram obtidos a partir da literatura pesquisada. Todos os iniciadores utilizados neste estudo foram testados quanto a sua especificidade.

Para a amplificação de regiões específicas do genoma, a reação de PCR foi realizada em um volume final de 50µL. As reações individuais foram compostas de água Milli-Q esterilizada, tampão de reação 1X (Promega), 3 mM de MgCl₂ (Promega), 0,2 mM de cada dNTP (ultrapure dNTP set [dATP, dCTP, dGTP e dTTP] – Amersham), 200 ng de cada iniciador, 1,5 U da enzima Taq DNA Polimerase I (Promega) e 3µL do DNA total obtido por choque térmico, como descrito anteriormente. A reação foi realizada nas seguintes condições: pré-desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 39 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C com duração variando de acordo com o tamanho do alvo, considerando a relação 1 minuto/1 Kb.

Para ensaios de clonagem em sistema heterólogo, as reações de PCR foram realizadas utilizando a enzima Platinum *Pfx* DNA Polymerase (Life Technologies), que

tem capacidade de editoração. A reação foi realizada nas seguintes condições: pré-desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 39 ciclos a 94°C por 15 segundos, 52°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto e 20 segundos, considerando a relação 1 minuto/1 Kb.

A amplificação pela reação de PCR foi visualizada através da corrida de 10 µL do produto de PCR em gel de agarose a 1,5% em TAE 1X.

Tabela 3.2 – Iniciadores utilizados neste estudo.

Iniciadores	Sequência nucleotídica (5´ - 3´)	Região amplificada	Referência
SHVg F	ATGCGTTATATTCGCCTGTG	Sequência parcial de <i>bla_{SHV}</i> e <i>bla_{LEN}</i>	LGMM
SHVg R	TTAGCGTTGCAGTGCTC	Sequência parcial de <i>bla_{SHV}</i> e <i>bla_{LEN}</i>	LGMM
SHV EXT F*	TTCATGGCGTTACCTTTGAC	Sequência completa de <i>bla_{SHV}</i>	LGMM
SHV EXT R*	CCGACAGAGTGCGGTATTTA	Sequência completa de <i>bla_{SHV}</i>	LGMM
SHV KVAR F*	GCTGAGGCTGGGCTAAATAT	Sequência completa de <i>bla_{LEN}</i>	LGMM
SHV KVAR R*	CCCCTGATGAGAACAAGGTT	Sequência completa de <i>bla_{LEN}</i>	LGMM
M13 F	GTAAAACGACGGCCAG	Vetor de clonagem	Invitrogen®
M13 R	CAGGAAACAGCTATGAC	Vetor de clonagem	Invitrogen®

* Estes iniciadores ancoram nas regiões flanqueadoras dos respectivos genes *bla_{SHV}* e *bla_{LEN}*.

3.7 Eletroforese em gel de agarose

Os géis foram preparados dissolvendo a agarose em tampão TAE 1X de modo a obter géis com a concentração final de 1,5%. As amostras e 1 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) do marcador de peso molecular (1Kb DNA Ladder – Promega) foram acrescentados do tampão de amostra (1/10 do volume de solução de DNA) e aplicados separadamente nos poços formados com o auxílio do pente. Diferentes volumes foram aplicados no gel dependendo do experimento: foram aplicados 5 μL de extração de DNA ou 7 μL de produto de PCR. A corrida eletroforética foi feita em tampão de corrida TAE 1X sob uma corrente de aproximadamente 80 Volts por 45 a 90 minutos. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), observado sob luz ultravioleta e registrado em foto com o equipamento Gel Logic 112 (Kodak).

3.8 Caracterização do espectro de resistência conferido pelos genes *bla* através de clonagem em sistema heterólogo

Após a amplificação com a enzima Platinum *Pfx* DNA polimerase (Life Technologies), os fragmentos que correspondiam à região codificante completa dos genes *bla* constitutivos (*bla*_{SHV} e *bla*_{LEN}) foram clonados no vetor Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. Estas construções foram utilizadas para transformar a linhagem DH5 α de *E. coli*, obtida previamente por competência química (Sambrook, Fritsch e Maniats, 1989). Após incubação a 37°C por 12-18 horas, as transformantes foram selecionadas em meio LB acrescido de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de canamicina. Posteriormente, as colônias recombinantes foram submetidas ao teste de suscetibilidade por disco difusão, como já descrito no item 3.4, com o objetivo de determinar o espectro de resistência conferido pelos genes *bla* previamente clonados. Para este fim, foram utilizados os β -lactâmicos ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/clavulanato, ticarcilina, piperacilina, cefalotina, ceftazidima, cefotaxima, cefoxitina, ceftriaxona, cefepima e aztreonam.

3.9 Determinação das sequências nucleotídicas (Sequenciamento)

Os fragmentos amplificados foram purificados com QIAquick PCR Purification Kit – QIAGEN, e fragmentos extraídos do gel de agarose foram purificados com QIAquick Gel Extraction Kit – QIAGEN. Posteriormente, os produtos purificados foram utilizados como molde de DNA para a reação de sequenciamento de suas duas fitas com o sistema comercial BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems – Perkin Elmer Co) no sequenciador automático 3730 XL (Life Technology Applied), pertencente à Plataforma de Sequenciamento PDTIS (FIOCRUZ). Esta técnica já está padronizada e vem sendo utilizada rotineiramente pelo laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do IOC. As análises das sequências foram realizadas com auxílio dos pacotes de programas de análise de sequências Chromas (v.2.1.1), Seqman (v.7.0.0), BioEdit (v.7.1.11) e MEGA5 (v.5.3). As sequências foram comparadas àquelas depositadas no banco de sequências Gene bank.

3.10 Análises computacionais

3.10.1 Análises *in silico* das β -lactamases de classe A de *Klebsiella* de isolados e genomas do banco de dados

Os genomas das espécies do gênero foram comparados e analisados quanto à presença das β -lactamases constitutivas SHV, LEN e OKP utilizando o banco de dados Biocyc (www.biocyc.org), que é uma coleção curada de genomas e vias metabólicas. As análises foram realizadas em genomas completos/rascunhos do gênero *Klebsiella* disponíveis neste banco.

Com o objetivo de identificar as sequências de β -lactamases em genomas não disponíveis no Biocyc, foram feitas buscas no Genbank utilizando o algoritmo BLAST *Genome*, considerando as sequências nucleotídicas (BLASTn) e aminoacídicas (BLASTp).

O alinhamento das β -lactamases recuperadas foi realizado utilizando a ferramenta ClustalW (Thompson, 1994) do programa BioEdit (Hall, 1999). Depois de alinhadas, as sequências foram analisadas quanto à presença de motivos funcionais e à identidade entre as sequências,

3.10.2 Análises *in silico* dos genomas de *Klebsiella*

3.10.2.1 MLSA

Fragmentos internos de sete genes conservados (intrínsecos), espaçados ao longo do genoma bacteriano, foram analisados de acordo com o esquema de MLST descrito por Diancourt e colaboradores (2005), que considera os sete genes: *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* e *tonB*. Desta forma, as sequências nucleotídicas de cada um dos sete genes foram alinhadas utilizando a ferramenta ClustalW (Thompson, 1994). A partir deste alinhamento foi construída uma árvore filogenética baseada no método de reconstrução pelo o método NJ e no modelo de distância Kimura 2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980) com 1000 réplicas de *bootstrap* (1000 réplicas) (Felsenstein, 1985) utilizando o programa MEGA5 (v.5.3) (Kumar et al., 1994 e Tamura et al, 2011). Os genes para o MLSA foram capturados de genomas completos disponíveis no Genbank e EBI (European Bioinformatics Institute). (Tabela 3.2).

3.10.2.1 rMLST

Para a análise do rMLST (Brown et al., 2001; Daubin et al., 2001), foram recuperados os 53 genes codificadores de proteínas ribossomais presentes nos genomas do gênero *Klebsiella* disponíveis *Genbank* utilizando o algoritmo *BLASTn* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências recuperadas foram concatenadas para análises posteriores. As sequências dos genes do rMLST foram alinhadas usando o programa Mafft para genes ribossomais (Kato et al., 2002). As análises genéticas foram realizadas no programa MEGA5 (v.5.3) (Kumar et al., 1994 e Tamura et al, 2011) considerando o método NJ. A confiabilidade da topologia de cada árvore foi realizada através da análise de *bootstrap* (1000 réplicas) (Felsenstein, 1985).

3.10.2.2 Análises filogenômicas por MLST utilizando o genoma core (cgMLST)

As análises filogenômicas foram baseadas na identificação, recuperação e concatenação de 2.437 genes parte do genoma *core* do gênero *Klebsiella* seguindo a metodologia antes descrita no item 3.10.2.2.

Tabela 3.3 – Genomas de *Klebsiella* utilizados neste estudo.

Genoma	Sigla *	Origem	Banco de Dados	Nº de acesso
<i>K. pneumoniae</i> CG43	KPCG43	Clínica	Genbank	NC_022566.1
<i>K. pneumoniae</i> KCTC 2242	KCTC 2242	ND**	Genbank	NC_017540.1
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> HS11286	KPHS11286	Clínica	Genbank	NC_016845.1
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578	KP_MGH78578	Clínica	Genbank	NC_009648.1
<i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044	KP_K2044	Clínica	Genbank	NC_012731.1
<i>K. pneumoniae</i> JM45	KP_JM45	Clínica	Genbank	NC_022082.1
<i>K. pneumoniae</i> 342	KP_342	Ambiental	Genbank	NC_011283.1
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 1084	KP_1084	Clínica	Genbank	NC_018522.1
<i>K. pneumoniae</i> C00007025	KPC00007025	Clínica	EBI	ERS249855
<i>K. pneumoniae</i> C00007032	KPC00007032	Clínica	EBI	ERS249862
<i>K. pneumoniae</i> C00007035	KPC00007035	Clínica	EBI	ERS249864
<i>K. pneumoniae</i> C00007399	KPC00007399	Clínica	EBI	ERS249872
<i>K. pneumoniae</i> C00007436	KPC00007436	Clínica	EBI	ERS249907
<i>K. variicola</i> At-22	KvarAT22	Ambiental	Genbank	NC_013850.1
<i>K. oxytoca</i> KCTC 1686	KOKCTC1686	ND**	Genbank	NC_016612.1
<i>K. oxytoca</i> E718	KOE718	Clínica	Genbank	NC_018106.1
<i>Klebsiella</i> sp. 1_1_55	K1155	Clínica	Genbank	PRJNA46351
<i>Klebsiella</i> sp. KTE92	KTE92	ND**	Genbank	PRJNA203507
<i>Klebsiella</i> sp. MS 92-3	KMS923	Clínica	Genbank	PRJNA66159
<i>Klebsiella</i> sp. OBRC7	KOBRC7	ND**	Genbank	PRJNA174238

*ND: Não disponível.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos genes de β -lactamases de classe A cromossômicas nos isolados do gênero *Klebsiella*

Quarenta e um isolados do gênero *Klebsiella* provenientes de diferentes regiões do Brasil, de origem clínica e ambiental, foram analisados para presença de genes de β -lactamases de classe A cromossômicas (Tabela 4.1).

Tabela 4.1- Diversidade de genes *bla* cromossômicos

Nº de Isolados	Origem	Fonte	Genes <i>bla</i>
3	Rio Branco – AC	3 clínicas	3 <i>bla</i> _{LEN}
5	Manaus – AM	5 clínicas	2 <i>bla</i> _{SHV} e 3 <i>bla</i> _{LEN}
2		2 ambientais (Rio Amazonas)	1 <i>bla</i> _{OXY} e 1 <i>bla</i> _{LEN}
11	São Luis – MA	11 clínicas	11 <i>bla</i> _{SHV}
21	Rio de Janeiro –RJ	21 clínicas	19 <i>bla</i> _{SHV} 1 <i>bla</i> _{OXY} 1 <i>bla</i> _{LEN}
1	Pará	1 ambiental (Rio Amazonas)	1 <i>bla</i> _{LEN}

4.2 Identificação dos alelos de *bla*_{SHV}

Os alelos de *bla*_{SHV} foram identificados a partir das sequências nucleotídicas/aminoacídicas (Figura 4.1). Os alelos identificados foram: 28, 110 e três novos, com espectro de resistência a ser definido, assim como, os alelos 1, 11, 62 que apresentam atividade restrita demonstrada em outros estudos (www.lahey.org/studies/webt.htm).

A maioria dos isolados carrega os alelos 1 e 11, enquanto que os demais estão distribuídos em isolados únicos (Tabela 4.2)

Os alelos 28, 110 e novo1, novo2 e novo3 diferem do SHV-1 (alelo de referência), por 1, 2, 5, 3, 4 aminoácidos, respectivamente, mas nenhum deles ocorre no sítio ativo (Arg-244, Thr-235, e Ser-70) segundo a classificação de Ambler (Figura 4.1).

Tabela 4.2 – Distribuição e espectro de atividade dos alelos de *bla*_{SHV}

Alelo <i>bla</i> _{SHV}	Nº de isolados	Isolado	Origem	Ano	Espectro
<i>bla</i> _{SHV-1}	10	*	Rio de Janeiro	2000-2012	Restrito
<i>bla</i> _{SHV-11}	20	*	Rio de Janeiro	2000-2012	Restrito
<i>bla</i> _{SHV-62}	1	KP 95	Rio de Janeiro	2005	Restrito
<i>bla</i> _{SHV28}	2	KP18/KP33	Rio de Janeiro	2005	
<i>bla</i> _{SHV-110}	1	KP26	Rio de Janeiro	2005	Caracterizados
<i>bla</i> _{SHV-novo1}	1	KP69	Rio de Janeiro	2006	neste
<i>bla</i> _{SHV-novo2}	1	KP109	Maranhão	2012	Estudo
<i>bla</i> _{SHV-novo-3}	1	KP118	Rio de Janeiro	2012	

(*) Esses isolados não foram identificados individualmente, pois a atividade desses alelos já é conhecida e o foco do trabalho passou a ser os alelos com atividade desconhecida.

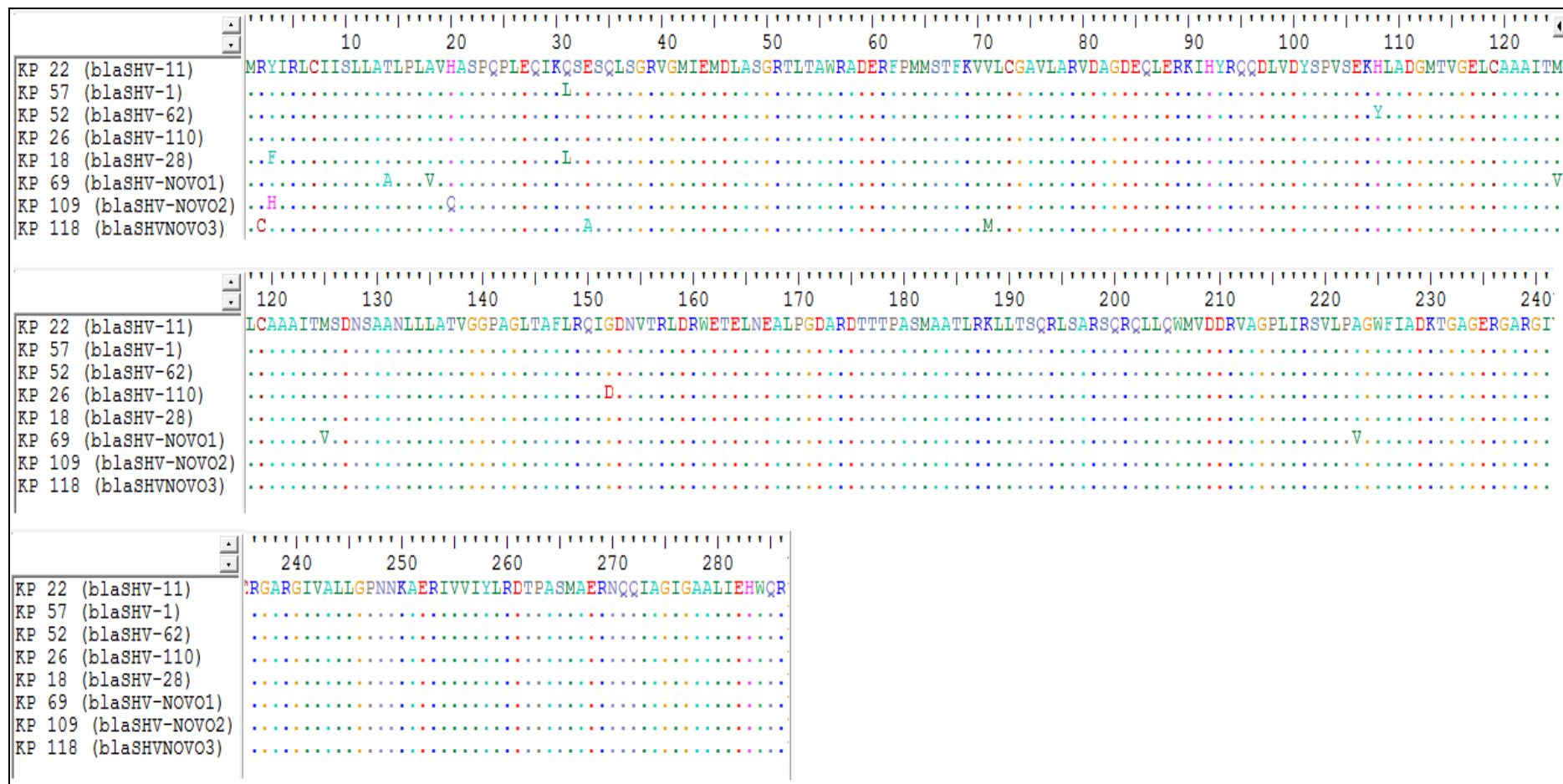


Figura 4.1 - Comparação das seqüências aminoacídicas de SHV

Nenhum dos alelos deste estudo apresentou as substituições aminoacídicas de G238S e E240K, que caracterizam as ESBLs até hoje identificadas. (Figura 4.2).

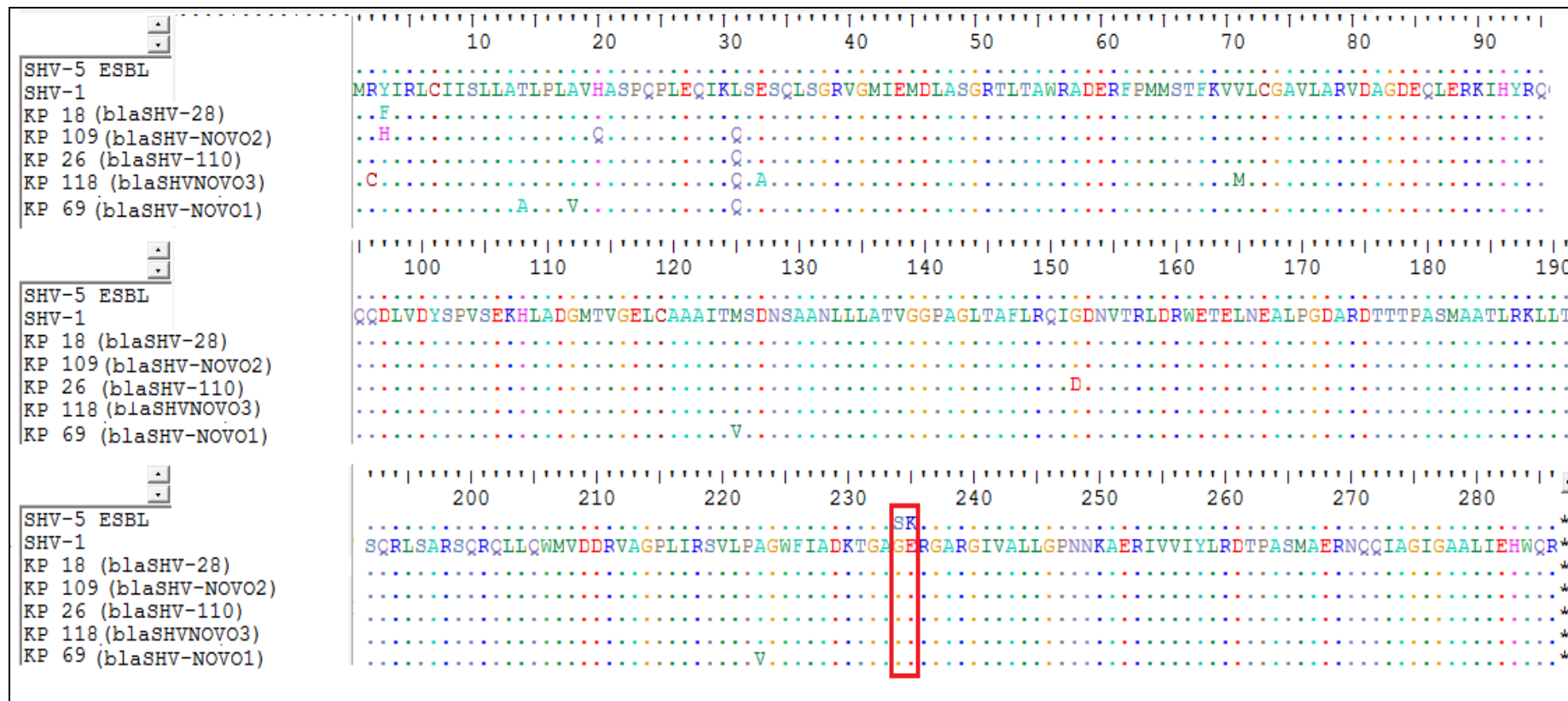


Figura 4.2 – Comparação dos alelos deste estudo com a SHV-1 (espectro restrito) e SHV-5 (espectro estendido). Em destaque G238S e E240K.

4.3 Determinação do perfil de susceptibilidade aos β -lactâmicos dos isolados carreadores dos distintos alelos de *bla*_{SHV}

Todas as amostras avaliadas neste estudo apresentaram perfil de resistência compatível com espectro estendido já que eram resistentes a ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO) e/ou cefepima (CPM), além das penicilinas (AMO, AMP, PRL, AMC e PPT) (Figura 4.3).

	AMO	AMP	PRL	AMC	PPT	CFL	CFO	CRO	CTX	CAZ	CPM	ATM
K18 (SHV-28)	R	R	R	S	I	R	R	S	I	R	S	S
K26 (SHV-110)	R	R	R	S	S	R	S	R	I	I	S	I
K69 (SHV-NOVO1)	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R
K109 (SHV-NOVO2)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
K118 (SHV-NOVO3)	R	R	R	I	I	R	S	R	R	R	R	R

Figura 4.3 – Perfil de susceptibilidade aos β -lactâmicos

R=Resistente, I=Intermediário, S=Sensível

Antimicrobianos: AMO= Amoxicilina, AMP= Ampicilina, PRL= Piperacilina, AMC= Amoxicilina/Clavulanato, CTX= Cefotaxime, CFL= Cefalotina, CFO= Cefoxitina, CAZ= Ceftazidime, CRO= Ceftriaxona, CPM= Cefepime, PTZ= Piperacilina/Tazobactam, ATM=Aztreonam.

4.4 Expressão de *bla*_{SHV} em sistema heterólogo

O espectro de resistência dos alelos identificados neste estudo foi definido através da sua expressão em um sistema heterólogo (*E. coli* sensível aos β -lactâmicos). Todas as *E. coli* transformadas com os cinco distintos *bla*_{SHV} apresentaram perfil de resistência restrito aos β -lactâmicos (Figura 4.4).

	AMO	AMP	PRL	AMC	PPT	CFL	CFO	CRO	CTX	CAZ	CPM	ATM
K18 (SHV-28)	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
K26 (SHV-110)	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
K69 (SHV-NOVO1)	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S
K109 (SHV-NOVO2)	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
K118 (SHV-NOVO3)	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Figura 4.4 – Perfil de susceptibilidade dos transformantes

R= Resistente, I= Intermediário, S= Sensível

Antimicrobianos: AMO= Amoxicilina, AMP= Ampicilina, PRL= Piperacilina, AMC= Amoxicilina/Clavulanato, CTX= Cefotaxime, CFL= Cefalotina, CFO= Cefoxitina, CAZ= Ceftazidime, CRO= Ceftriaxona, CPM= Cefepime, PTZ= Piperacilina/Tazobactam, ATM=Aztreonam.

4.5 Identificação e caracterização da β -lactamase de classe A cromossômica de *K. variicola*

Analisando o único genoma completo de *K. variicola* At-22 utilizando o *website* (www.biocyc.org), foi possível observar nove genes putativos codificadores de β -lactamases. Considerando os motivos funcionais característicos de cada classe de β -lactamase (A-D), verificamos que apenas Kvar_2736 (gene putativo) apresentou todos os motivos característicos de enzimas da classe A. Enquanto que a Kvar_2650 apresentou dois dos três motivos funcionais de uma β -lactamase de classe C. Não foi possível definir a classe dos demais genes putativos (sete), já que não apresentavam os motivos funcionais que classificam as β -lactamases. Portanto, não foram incluídos nas análises subsequentes.

A partir desta evidência fomos analisar a sequência correspondente à β -lactamase de classe A identificada no genoma de *K. variicola* (Kvar_2736).

Buscas no Genbank revelaram que este gene *bla* putativo de *K. variicola* apresentava 99% de similaridade com dezenas de sequências do gene *bla*_{LEN}. Por outro lado, esta mesma sequência apresentava apenas 91% de identidade com centenas de genes *bla*_{SHV}.

Quando realizada a caracterização dos genes de β -lactamases de classe A cromossômicas nos isolados deste estudo, foi identificada a presença do gene *bla*_{LEN} em nove amostras (Tabela 4.1). Os mesmos compartilhavam de 99 a 100% de identidade com a β -lactamase de classe A identificada no genoma de *K. variicola* (Kvar_2736) (Figura 4.5).

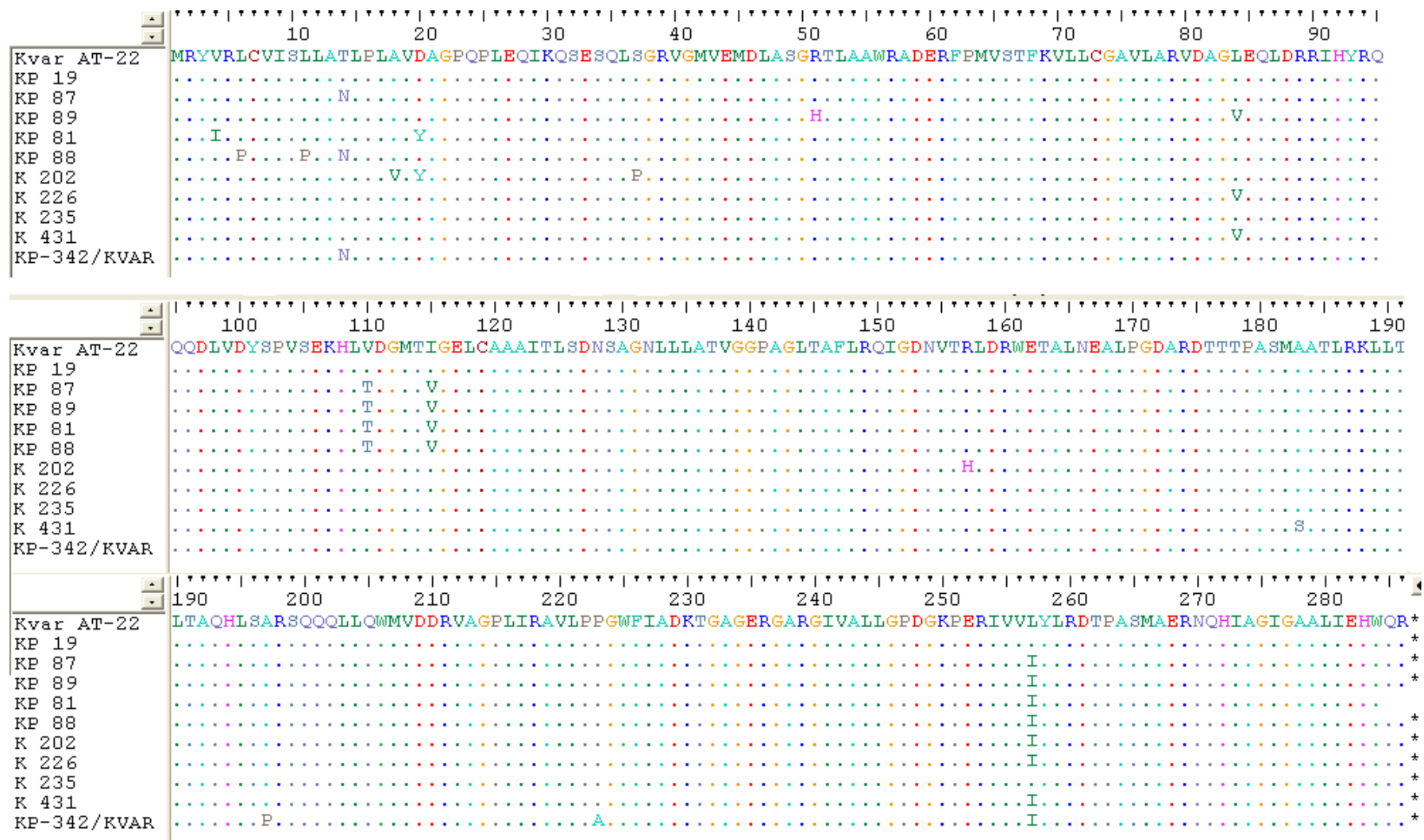


Figura 4.5: Comparação da sequência aminoacídica dos diferentes alelos da β -lactamase LEN.

Com o objetivo de verificar a distribuição do gene *bla*_{LEN} nos genomas completos disponíveis de *Klebsiella*, realizamos análises *in silico* utilizando as informações do Biocyc.

A figura 4.6 mostra o resultado desta busca considerando os genomas disponibilizados, que eram: *K. oxytoca* (3), *K. pneumoniae* (7), *Klebsiella* sp (3) e *K. variicola* (1). A seta cor de rosa hachurada mostra a região que apresenta similaridade com β -lactamases de classe A, incluindo *bla*_{LEN}, *bla*_{SHV} e *bla*_{OXY}, os dois últimos apresentam menos de 91% de similaridade com *bla*_{LEN}. Curiosamente, além de *K. variicola* At-22, a *K. pneumoniae* 342 e a *Klebsiella* sp. 1.1_55 apresentam genes putativos com 99% de similaridade com *bla*_{LEN} em seu cromossomo. Estendendo a busca ao Genbank, identificamos a presença do *bla*_{LEN} em mais um genoma de *Klebsiella* sp.

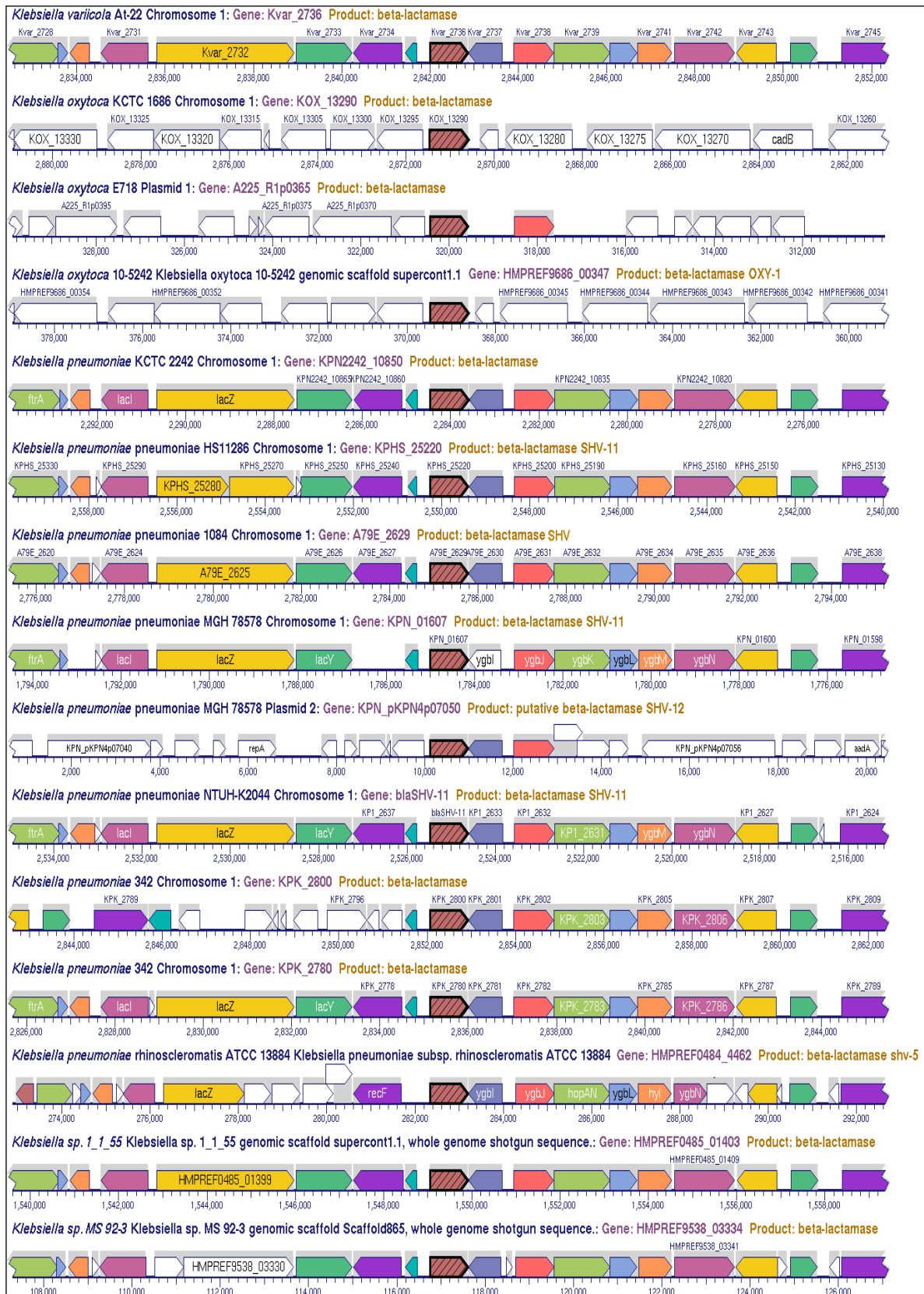


Figura 4.6 – Contexto genômico e gene de β -lactamase de classe A de *K. variicola* (em rosa hachurado) em genomas de *Klebsiella*.

4.6 O gene *bla*_{LEN} e a resistência aos β-lactâmicos

Todos os alelos de *bla*_{LEN} identificados neste estudo (Tabela 4.3) correspondem a alelos novos e portanto ainda não caracterizados quanto à sua atividade de resistência aos β-lactâmicos (Figura 4.3). Dois isolados, K19 e K235, apresentam o mesmo alelo de *bla*_{LEN} encontrado no genoma completo de *K. variicola* At-22.

Tabela 4.3 - Alelo de *bla*_{LEN} versus *Klebsiella*

Nº do isolado	Origem	Fonte	Ano	Alelo de <i>bla</i> _{LEN}
K19	Rio de Janeiro	Clínica	2005	Novo-1
K81	Amazonas	Ambiental	2006	Novo-2
K87	Amazonas	Clínica	ND	Novo-3
K88	Amazonas	Clínica	ND	Novo-4
K89	Amazonas	Clínica	ND	Novo-5
K020	Pará	Ambiental	ND	Novo-6
K226	Acre	Clínica	ND	Novo-7
K235	Acre	Clínica	ND	Novo-1
K431	Acre	Clínica	ND	Novo-8
Kv At22	Costa Rica	Ambiental	ND	Novo-1

ND = não disponível

Todos os isolados carreadores de *bla*_{LEN} apresentam perfil de resistência restrito aos β-lactâmicos (Figura 4.7).

	AMO	AMP	PRL	AMC	PPT	CFL	CFO	CRO	CTX	CAZ	CPM	ATM
K19 (LEN-novo1)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
K81 (LEN-novo2)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
K87 (LEN-novo3)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
K88 (LEN-novo4)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
K89 (LEN-novo5)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
K020 (LEN-novo6)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
K226 (LEN-novo7)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
K235 (LEN-novo1)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
K431 (LEN-novo8)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Figura 4.7- Perfil de susceptibilidade aos β -lactâmicos dos isolados que carregam alelos do gene *bla*_{LEN}

R= Resistente, I= Intermediário, S= Sensível

Antimicrobianos: AMO= Amoxicilina, AMP= Ampicilina, PRL= Piperacilina, AMC= Amoxicilina/Clavulanato, CTX= Cefotaxime, CFL= Cefalotina, CFO= Cefoxitina, CAZ= Ceftazidime, CRO= Ceftriaxona, CPM= Cefepime, PTZ= Piperacilina/Tazobactam, ATM=Aztreonam.

4.7 Expressão de *bla*_{LEN} em sistema heterólogo

O espectro de resistência dos alelos de *bla*_{LEN} foi testado através da sua expressão em um sistema heterólogo (*E. coli* sensível aos β -lactâmicos). Assim poderíamos determinar se o perfil restrito apresentado pelas *Klebsiellas* selvagens era reflexo da atividade do alelo ou se era reflexo da modulação da região reguladora dos mesmos. Todas as *E. coli* transformadas com estes alelos apresentaram perfil de resistência restrito aos β -lactâmicos, ou seja, resistência à amoxicilina, ampicilina e piperacilina. Interessantemente, também apresentaram resistência à amoxicilina com clavulanato (Figura 4.8).

	AMO	AMP	PRL	AMC	PPT	CFL	CFO	CRO	CTX	CAZ	CPM	ATM
K19 (LEN-novo1)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
K81 (LEN-novo2)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
K87 (LEN-novo3)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
K88 (LEN-novo4)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
K89 (LEN-novo5)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
K020 (LEN-novo6)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
K226 (LEN-novo7)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
K235 (LEN-novo1)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
K431 (LEN-novo8)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S

Figura 4.8- Perfil de susceptibilidade dos transformantes

R= Resistente, I= Intermediário, S= Sensível

AMO= Amoxicilina, AMP= Ampicilina, PRL= Piperacilina, AMC= Amoxicilina/Clavulanato, CTX= Cefotaxime, CFL= Cefalotina, CFO= Cefoxitina, CAZ= Ceftazidime, CRO= Ceftriaxona, CPM= Cefepime, PTZ= Piperacilina/Tazobactam, ATM=Aztreonam.

4.8 Taxonomia genômica das *Klebsiella*

As espécies de *Klebsiella* foram inicialmente estabelecidas com base em características fenotípicas. Análises utilizando marcadores genéticos discriminaram três grupos filogenéticos dentro da espécie *K. pneumoniae*. Posteriormente, verificou-se que o grupo filogenético KpIII também é composto de isolados da espécie *K. variicola*. Além disso, os isolados que pertencem a este grupo carregam o gene *bla*_{LEN}. Com base nesse cenário, fomos investigar através da taxonomia genômica a espécie dos genomas que carregavam *bla*_{LEN}.

4.8.1 MLSA

O esquema de MLSA de *K. pneumoniae* é composto de sete genes. Assim, estes sete genes foram recuperados dos 18 genomas do banco de dados identificados como das espécies: *K. pneumoniae* (KPHS11286, MGH 78578, NTUH-K2044, JM45, KP342, 1084, Kp24, Kp31, Kp33, Kp41 e Kp76), *K. variicola* (KvAT22), *K. oxytoca* (KOKCTC1686, KOE718) e *Klebsiella* sp (K1155, KTE92, KMS923, K4144FAA, KALNJ01). A árvore genética destes genes concatenados revelou a formação de três grupos que correspondiam às espécies *K. pneumoniae*, *K. variicola* e *K. oxytoca*. Segundo a topologia da árvore, a espécie *K. oxytoca* se comportou como grupo externo em relação às duas outras espécies analisadas (Figura 4.9). Curiosamente, vários genomas anotados no banco de sequências como *K. pneumoniae* (n=6) e *Klebsiella* sp. (n=2) agruparam com *K. variicola* At-22. Além disso, todos os genomas que agruparam com *K. variicola* At-22 carregam alelos de *bla*_{LEN}. Enquanto que os que agrupam com *K. pneumoniae* carregam alelos de *bla*_{SHV} (dados não mostrados). Portanto, surgiu a primeira evidência de que isolados de *Klebsiella pneumoniae* seriam na verdade *K. variicola*, e que *bla*_{LEN} seria marcador desta espécie.

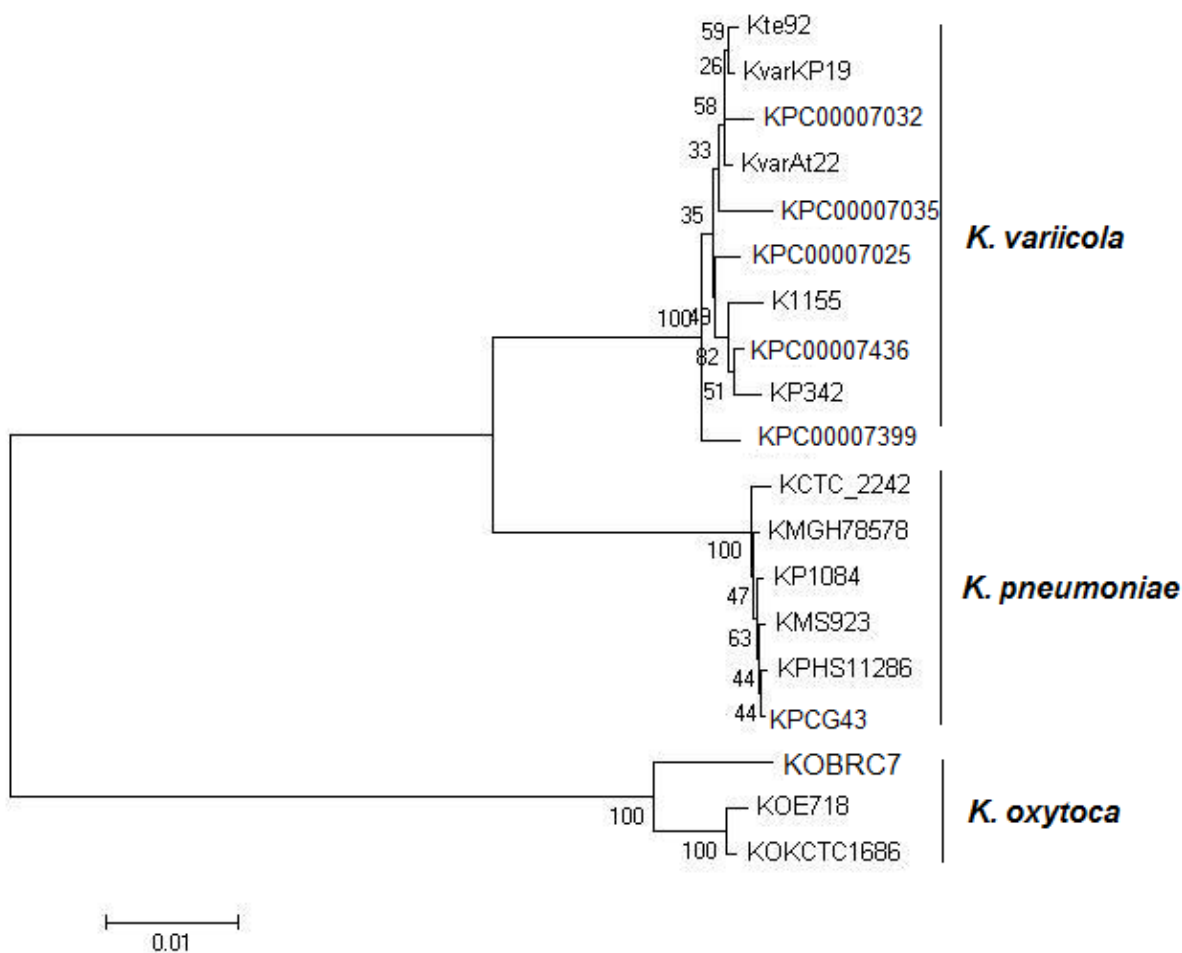


Figura 4.9 - Árvore de MLSA do gênero *Klebsiella*. Método de reconstrução Neighbor Joining (NJ) e modelo de distância Kimura 2-parâmetros (K2P)

4.8.2 rMLST

Para corroborar os resultados obtidos pela análise de MLSA, foi realizado uma análise com base em 53 proteínas ribossomais (em torno de 21.000 nucleotídeos) recuperadas dos mesmos genomas disponíveis.

A topologia da árvore genética gerada a partir da concatenação de 2.437 genes ortólogos corroborou os resultados obtidos com a análise a partir do MLSA. Da mesma forma, vários genomas anotados no banco de sequências como *K. pneumoniae* (n=6) e *Klebsiella sp.* (n=2) agruparam com *K. variicola* AT-22 e a topologia apresentando dois grupos com as duas espécies se manteve. (Figura 4.10).

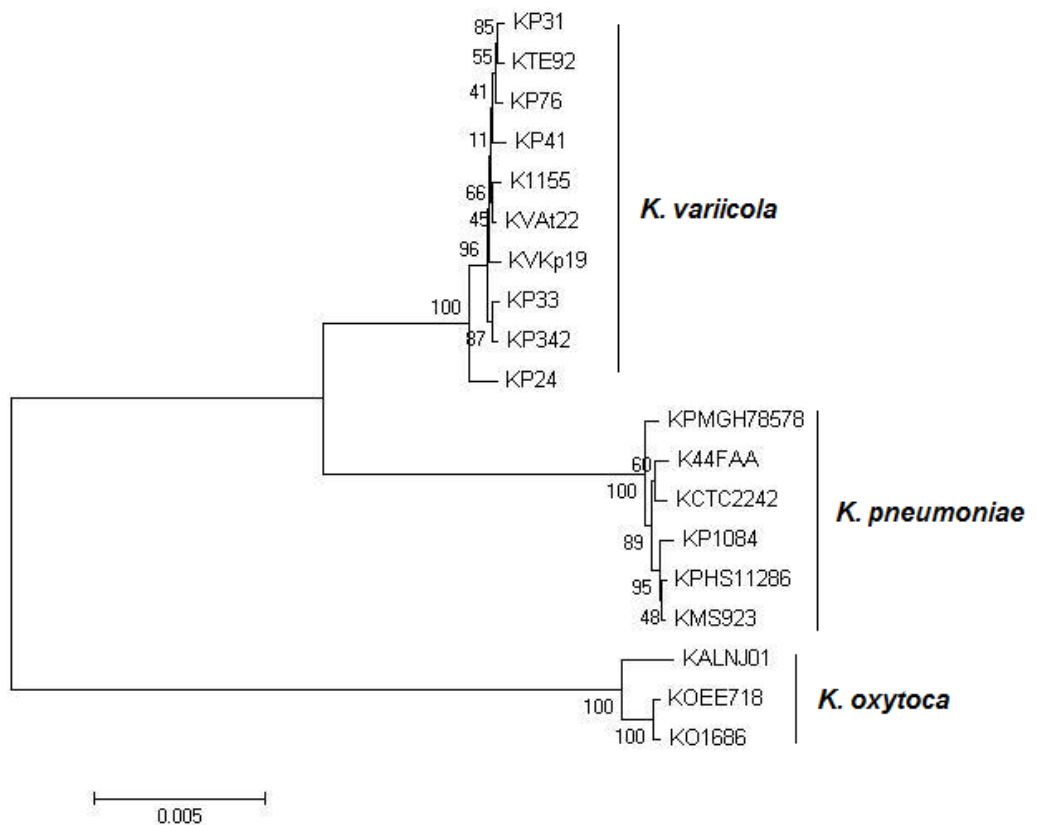


Figura 4.10- Árvore de rMLST de *Klebsiella*. Método de reconstrução NJ e modelo de distância K2P.

4.8.3 cgMLST

A topologia de uma super-árvore construída a partir da concatenação dos genes que compõem o genoma core revelou-se a mesma observada nas análises de rMLST e MLSA, onde os três grupos formados representavam cada uma das três espécies, e onde alguns dos genomas identificados como *K. pneumoniae* e *Klebsiella* sp. agruparam com a *K. variicola* (Figura 4.11).

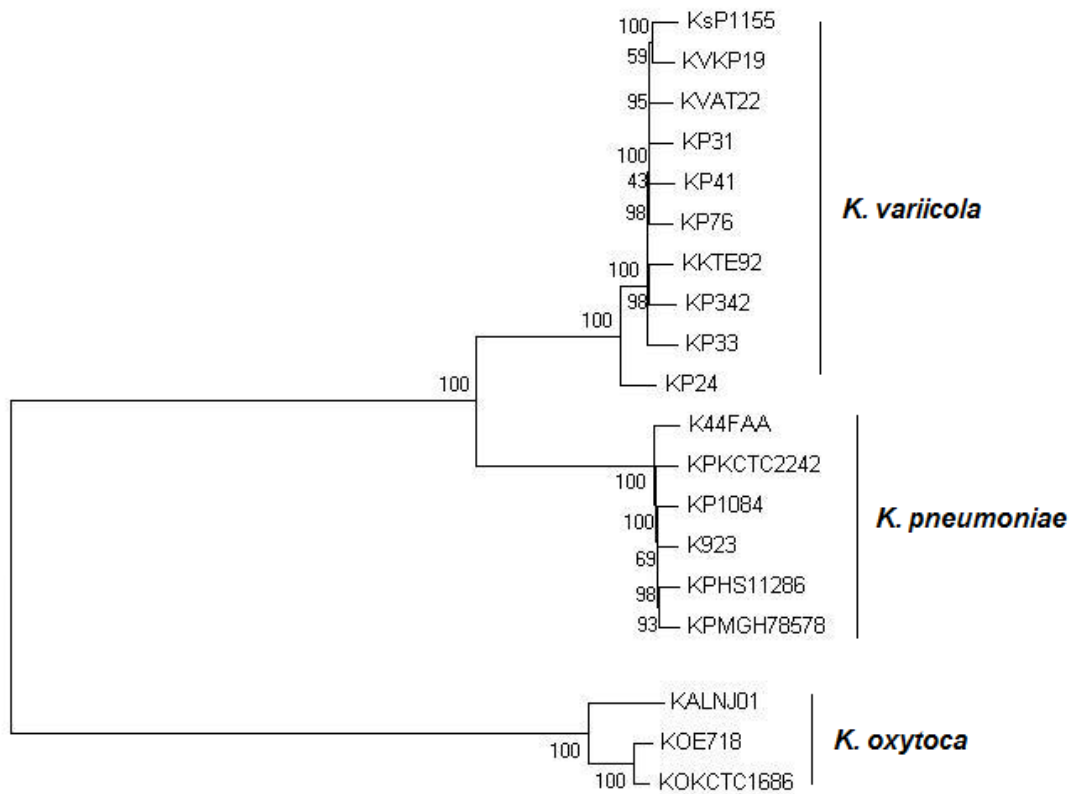


Figura 4.11- Árvore de cgMLST de isolados de *Klebsiella* (*K. pneumoniae*, *K. variicola* e *K. oxytoca*). Método de reconstrução N) e modelo de distância K2P.

4.8.4 MLSA dos isolados carreadores de *bla*_{LEN} de nosso estudo

Recuperamos os sete genes do MLSA de alguns de nossos isolados carreadores de *bla*_{LEN} e esta informação foi utilizada para construir uma árvore genética. Todos eles agruparam com *K. variicola* (dados não mostrados).

5 DISCUSSÃO

Uma das questões cruciais, tanto para a clínica médica quanto para a microbiologia, é a emergência da resistência bacteriana aos antimicrobianos.

No presente estudo avaliou-se os genes codificadores de enzimas de classe A, como o *bla*_{SHV}, que é constitutivo de *K. pneumoniae*, mas que também encontra-se associado a elementos móveis nesta e em outras espécies. Sabe-se que o espectro de ação frente aos β-lactâmicos se dá em função do alelo de *bla*_{SHV} carregado pela bactéria. Devido ao impacto na clínica médica desta resistência foi criado um *website* (www.lahey.org/studies/webt.htm), que registra a associação alelo/atividade. Contudo, só é possível determinar a relação alelo/atividade quando a ação da enzima é demonstrada em um sistema controlado. Até o momento, 183 alelos de *bla*_{SHV} já foram descritos, mas destes, apenas 88 estão definidos quanto ao espectro de atividade (www.lahey.org/studies/webt.htm). Destes 88 alelos, 44 alelos estão definidos como espectro estendido, 37 espectro restrito e 7 como resistentes aos inibidores mas 95 alelos ainda não têm comprovação experimental do espectro de atividade, entre eles estão *bla*_{SHV-28} e *bla*_{SHV-110}. Em nosso estudo a atividade destes dois alelos foi definida como restrita.

Curiosamente, Jemina e Verghese (2009) e Barguigua e colaboradores (2013) afirmam que o alelo 28 de *bla*_{SHV} codificaria uma β-lactamase de espectro estendido. Da mesma forma, Barguigua et al., também afirma que a SHV-110 conferiria resistência a cefalosporinas de terceira geração e, portanto, este alelo também corresponderia a uma ESBL. Porém, as conclusões destes estudos não foram baseadas em experimentos preconizados para tal caracterização. Estes estudos chegaram às suas conclusões a partir do fenótipo de resistência dos isolados selvagens, que além do gene *bla*_{SHV} também carregavam alelos do gene *bla*_{CTX-M}, que poderia ser portanto, o determinante do fenótipo, uma vez que todos os alelos de *bla*_{CTX-M} estão relacionados à resistência estendida aos β-lactâmicos. Estudos enviesados como estes são encontrados com frequência.

Os alelos de *bla*_{SHV}, tanto os novos quanto *bla*_{SHV-28} e *bla*_{SHV-110} de nosso estudo são cromossomais e todos foram caracterizados aqui como de espectro restrito. Esta informação não está disponível em relação aos demais alelos de *bla*_{SHV} com espectro definido. Realizamos uma análise preliminar visando determinar se haveria prevalência de alelos de espectro restrito associado aos cromossomos e vice-versa,

ou seja, se os alelos de espectro estendido estariam associados a plasmídeos. Esta associação parece acontecer, já que a grande maioria dos *bla*_{SHV} de espectro estendido estaria em plasmídeos. Isto faz sentido, pois, apenas duas modificações nucleotídicas podem levar a alteração dos aminoácidos que caracterizam o sítio ativo da enzima e seu espectro. Portanto, os *bla*_{SHV} que estão em plasmídeos evoluiriam mais rapidamente para alelos de espectro estendido, pois teriam uma maior probabilidade de acumular mutações, já que os mesmos encontram-se constantemente sob pressões seletivas, passam por mais eventos replicativos, onde ocorrem as mudanças nucleotídicas, quando comparado ao cromossomo.

O fato de uma ou duas mutações gerar uma alteração significativa na atividade enzimática é uma questão preocupante para saúde pública, pois os β-lactâmicos são antimicrobianos amplamente utilizados na clínica para tratar diversas infecções causadas por bactérias gram-negativas e gram-positivas. Além disso, estes genes além de cromossômicos também são identificados em associação com elementos que são transferíveis inter- e intra-espécies. E como discutido acima, os alelos de espectro estendido estariam associados a estes elementos, os plasmídeos. Portanto, os plasmídeos teriam um impacto expressivo em relação à emergência desta resistência entre bactérias (Hammond et al., 2008; Andrade et al., 2011).

Até o presente, 26 alelos de *bla*_{LEN} constavam dos registros do *website* (www.pasteur.fr) e todos aqueles que foram avaliados quanto ao espectro de resistência apresentaram espectro restrito frente aos β-lactâmicos. Em nosso estudo, oito novos alelos foram identificados, todos apresentando espectro restrito de ação. Traçando um paralelo com o observado para *bla*_{SHV}, ou seja, que os genes cromossomais codificariam β-lactamases de espectro restrito, parece que o mesmo se aplica ao *bla*_{LEN}, já que até o momento, não foram identificados alelos de *bla*_{LEN} codificadores de ESBLs. Da mesma forma, não foram identificados alelos de *bla*_{LEN} em plasmídeos.

Uma característica das espécies do gênero *Klebsiella* é a presença constitutiva de genes codificadores de β-lactamases de classe A, como ocorre em *K. pneumoniae* em relação ao *bla*_{SHV} e em *K. oxytoca* em relação ao *bla*_{OXY}. Já em relação à espécie *K. variicola*, que foi descrita em 2004 (Rosenblueth et al. 2004), nenhuma β-lactamase cromossômica havia sido identificada até o momento.

A disponibilidade de um genoma completo de *K. variicola* possibilitou que, no contexto deste estudo, surgisse uma evidência da presença de um gene de β-

lactamase classe A cromossômica associada à esta espécie. Interessantemente, nós havíamos caracterizado *bla*_{LEN} dentre os nossos isolados, identificados fenotipicamente como *K. pneumoniae* e que nas análises de MLSA formavam um grupo com *K. variicola*. Este conjunto de dados somado a algumas informações da literatura nos fizeram hipotetizar que LEN seria a β -lactamase da espécie *K. variicola*.

A questão da limitação dos critérios bioquímicos para a classificação de espécies de bactérias é muito discutida. Em particular, para bactérias do gênero *Klebsiella*, já havia sido mostrado a fragilidade da identificação com bases fenotípicas (Alves et al., 2006). Por exemplo, a prova do adonitol, que diferenciaria *K. pneumoniae* de *K. variicola*, se mostrou não discriminatória a partir do momento que mais isolados destas duas espécies eram analisados (Alves et al., 2006). Além disso, a utilização do gene ribossomal 16S destas duas espécies não é muito conveniente para definir espécies de *Klebsiella* já que são muito conservados e podem ser objeto de recombinação e conversão gênica. (Rosenblueth et al., 2004) Portanto, isolados da espécie *K. variicola*, poderiam estar sendo classificados como *K. pneumoniae*. De fato, o isolado *K. pneumoniae* 342, que tem seu genoma completo sequenciado e publicado, embora pertença à espécie *K. variicola* como mostrado por análises genômicas, havia sido identificado como *K. pneumoniae*, por ter apresentado alta similaridade com o 16S desta espécie (Fouts et al. 2008). Para espécies muito próximas, como *K. pneumoniae* e *K. variicola*, a aplicação da taxonomia genômica é crucial. No presente estudo, mostramos através de análises genômicas, que diversos genomas de *K. pneumoniae*, disponíveis em bancos públicos, são na verdade *K. variicola*, incluindo genomas que foram sequenciados a partir de isolados clínicos.

Logo, considerando as limitações dos testes fenotípicos se faz necessário identificar um marcador genético de fácil aplicação na rotina clínica para diferenciar *K. pneumoniae* e *K. variicola*. Portanto, baseado em todas as análises genéticas e filogenômicas, sugerimos que o gene *bla*_{LEN} seja considerado um marcador genético de *K. variicola*. A revelação de um marcador para esta espécie permitirá conclusões mais robustas quanto à prevalência e extensão desta bactéria na clínica e frente aos β -lactâmicos.

Aparentemente, *K. pneumoniae* e *K. variicola* teriam dinâmicas epidemiológicas diferentes (Martínez et al., 2004). *K. pneumoniae* estaria mais relacionada a infecções humanas do que *K. variicola*, que tem associação com

plantas, talvez devido a presença de genes de fixação de nitrogênio, que são importantes nesta relação e que vimos não ocorrerem em *K. pneumoniae* (dados não mostrados deste estudo).

A geração de mais informações genômicas relativas a estas duas espécies vão permitir um delineamento mais preciso destas dinâmicas e do papel da espécie *K. variicola* na clínica médica.

6 CONCLUSÕES

- *bla_{LEN}* é o gene de β -lactamase de classe A constitutivo da espécie *K. variicola*;
- A prevalência de infecções humanas causadas por *K. variicola* é possivelmente subestimada;
- O MLSA é uma ferramenta robusta para a identificação de espécies do gênero *Klebsiella*;
- O grupo filogenético KpIII compreende, exclusivamente, a espécie *K. variicola*;
- Os *bla_{SHV}* cromossomais apresentam espectros restritos em contraste com os encontrados em plasmídeos, onde estão os *bla_{SHV}* de espectro estendido;
- A taxonomia genômica discrimina as duas espécies *K. pneumoniae* e *K. variicola*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves MS, Rubens CSD, Castro ACD, Riley LW, Moreira BM. 2006. Identification of Clinical Isolates of Indole-Positive and Indole-Negative *Klebsiella* spp. 2006 Journal of Clinical Microbiology 44(10): 3640–46.

Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. 1991. Biochem. J. 276:269 - 270.

Ambler RP. The structure of β -lactamases. Philos. Trans. R. Soc. London Ser 1980. B 289:321–331.

Andrade LN, Curiao T, Cristina J, Longo JM, Carneiro E, Martinez R, Rodrigues FB, Filho AB, Evaristo MA, Peloso PFD, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baqueiro F, Cantón R, Darini ALC e Coque TM. 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(7):3579 201.

Arakawa Y, Ohta M, Kido N, Fujii Y, Komatsu T, Kato N. Close evolutionary relationship between the chromosomally encoded β -lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* and the TEM β -lactamase gene mediated by R plasmids. FEBS Lett. 1986. 207(1):69-74

Babini GS, Livermore DM. Are SHV β -lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(8):2230.

Barguigua A, Otmani FE, Talmi M, Reguig A, Jamali L, Zerouali K, Timinouni M. Prevalence and Genotypic Analysis of Plasmid-Mediated β -Lactamases Among Urinary *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Moroccan Community. 2013. The Journal of antibiotics 66(1): 11–16.

Barlow M, Hall BG. Predicting evolutionary potential: in vitro evolution accurately reproduces natural evolution of the TEM β -lactamase. *Genetics*. 2002. 160:823–832.

Brisse S, Verhoef J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001. 51:915-24.

Brisse S, Himbergen TV, Kusters K, Verhoef J. Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004. 10 922–950.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1995. 39:1211–1233.

Bush- K. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes [Internet]. 2014. Disponível em: <http://www.lahey.org/studies/webt.htm/>.

Chelius MK, Triplett EW. Diazotrophic endophytes associated with maize. In: Triplett EW, ed. *Prokaryotic Nitrogen Fixation: a Model System for the Analysis of a Biological Process*. Norfolk, UK: Horizon Scientific Press. (2000) 779–792

Chelius MK, Triplett EW. Immunolocalization of Dinitrogenase Reductase Produced by *Klebsiella pneumoniae* in Association with Zea Mays. *L. Appl. Environ. Microbiol*. 2000. 66(2):783-787.

Coenye T, Gevers D, Van de Peer Y, Vandamme P, Swings J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *EMS Microbiol Rev*. 2005 (2):147-67.

D'Agata EM. Rapidly rising prevalence of nosocomial multidrug-resistant, gram-negative bacilli: a 9-year surveillance study. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004 25(10):842-846.

Danhorn T, Fuqua C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2007. 61: 401–422

Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin Microbiol.* 2005. 43(8):4178-82.

Drawz SM, Bonomo RA. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010, 23(1):160

Felsenstein, J. *Evolution* 1985. 39, 783-791

Fevre C, Jbel M, Passet V, Grimont PAD, Brisse S. Six Groups of the OXY β -Lactamase Evolved over Millions of Years in *Klebsiella oxytoca*. *Antibmicrob. Agents Chemother.* 2005 49(8):3453.

Fournier B, Arlet G, Lagrange PH, Philippon A. *Klebsiella oxytoca*: Resistance to aztreonam by overproduction of the chromosomally encoded β -lactamase

Fouts DE, Tyler HL, DeBoy RT, Daugherty S, Ren Q, Badger JH, Durkin AS, Huot H, Shrivastava S, Kothari S, Dodson RJ, Mohamoud Y, Khouri H, Roesch LFW, Krogfelt KA, Struve C, Triplett EW, Methé BA. Complete genome sequence of the N²-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and Virulence Predictions Verified in Mice. *PLoS Genetics* 2008. 4(7)

Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, Stackebrandt E, Van de Peer Y, Vandamme P, Thompson FL, Swings J. Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol.* 2005 3(9):733-9.

Gonçalves, ER, Rosato YB. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S–23S rDNA intergenic spacer sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. 52:355–361.

Hægghman S, Lofdahl S, Paauw A, Verhoef J, Brisse S.. Diversity and Evolution of the Class A Chromosomal β -lactamase Gene in *Klebsiella pneumoniae* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004. 2400–2408 Vol. 48, No. 7.

Hammond DS, Harris T, Bell J, Turnidge J, Giffard PM. Selection of SHV extended-spectrum-beta-lactamase-dependent cefotaxime and ceftazidime resistance in *Klebsiella pneumoniae* requires a plasmid-borne *bla*_{SHV} gene. Antimicrob Agents Chemother. 2008. 52(2):441–5.

Hammond DS, Schooneveldt JM, Nimmo GR, Huygens F, Giffard PM. *bla*_{SHV} genes in *Klebsiella pneumoniae*: different allele distributions are associated with different promoters within individual isolates, Antimicrob. Agents Chemother. 2005, 49(1):256.

Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. BMJ. 1998. 317(7159): 657–60.

Högenauer C, Langner C, Beubler E, Lippe IT, Schicho R, Gorkiewicz G, Krause R, Gerstgrasser N, Krejs GJ, Hinterleitner TA. *Klebsiella oxytoca* as a causative organism of antibiotic-associated hemorrhagic colitis. N. Engl. J. Med. 2006. 355:2418–2426.

Jacoby GA, Genetics of extended-spectrum β -lactamases. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1994. 13 Suppl 1:S2-11.

Jacoby GA, Han P. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 1996, 34(4):908.

Jain, A. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing gram-negative bacteria in septicemic neonates in a tertiary care hospital. Journal of Medical Microbiology 2003 52(5): 421–25.

Jemima SA, Verghese S. SHV-28, an extended-spectrum β -lactamase produced by a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* in South India. Indian J Med Microbiol 2009 27:51-4

Jolley KA, Bliss CM, Bennett JS, Bratcher HB, Brehony C, Colles FM, Wimalarathna H, Harrison OB, Sheppard SK, Cody AJ, Maiden MCJ. Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology* 2012, 158, 1005–1015

Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002 30(14):3059-66.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980. 16(2):111-20.

Konstantinidis KT, Tiedje JM. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *J. Bacteriol.* 2005, 187(18):6258.

Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* 2007. 23(10):1289-91

Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software for microcomputers. *Comput Appl Biosci* 1994. 10:189-191.

Laible G, Spratt BG, Hakenbeck R. Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 1991. 5:1993–2002.

Lai CC, Lin TL, Tseng SP, Huang YT, Wang JT, Chang SC, Teng LJ, Wang JT, Hsueh P. Pelvic abscess caused by New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Klebsiella oxytoca* in Taiwan in a patient who underwent renal transplantation in china. *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 2011. 71(4): 474–75.

Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs.* 2009. 69(12): 1555–1623.

Liao, TL, Lin AC, Chen E, Huang TW, Liu YM, Chang YH, Lai JF, Lauderdale TL, Wang JT, Chang SC, Tsai SF, Chen YT. Complete genome sequence of *Klebsiella oxytoca* E718, a New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing nosocomial strain. *Journal of Bacteriology*. 2012. 194(19): 5454.

Lin AC, Liao TL, Lin YC, Lai YC, Lu MC, Chen YT. Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* 1084, a Hypermucoviscosity-negative K1 clinical strain 2012. *J. Bacteriol*. 194(22):6316.

Liu P, Li P, Jiang X, Bi D, Xie Y, Tai C, Deng Z, Rajakumar K, Ou HY. Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* subsp.*pneumoniae* HS11286, a Multidrug-resistant strain isolated from human sputum. *J. Bacteriol*. 2012, 194(7):1841

Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews* 1995. 8(4): 557–84.

Martínez J, Martínez L, Rosenblueth M, Silva J, Martínez-Romero E. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. *Int Microbiol*. 2004. (4):261–8.

Matagne A., Lamotte-Brasseur J., Frère JM. Catalytic properties of class a β -lactamases: efficiency and diversity. *Biochem. J*. 1998. 330, 581-598.

Mazel, D. Integrons: Agents of Bacterial Evolution. *Nature reviews. Microbiology* 2006. 4(8): 608–20.

Mendonça N, Ferreira E. Genetic diversity of genes encoding OKP and LEN β -lactamases produced by clinical *Klebsiella pneumoniae* strains in Portugal. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2009. 63 334–338.

Monnet D, Freney J. Method for differentiating *Klebsiella planticola* and *Klebsiella terrigena* from other *Klebsiella* species. *J. Clin. Microbiol* 1994. 32:1121-1122.

Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*. 2004. 64, 159—204

Ogawa W, Li DW, Yu P, Begum A, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* MGH78578 and cloning of genes responsible for the resistance. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2005. 28(8):1505–8.

Pinto-Tomás AA, Anderson MA, Suen G, Stevenson DM, Chu FST, Cleland WW, Weimer PJ, Currie CR. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. *Science*. 2009. 326(5956):1120–23.

Podschun R, Pietisch S, Höller C, Ullmann U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. 67(7): 3325-3327.

Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11(4):589-603.

Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical microbiology and infection*. 2004. 10, 12–26

Poole K. Outer Membranes and Efflux: The path to multidrug resistance in gram-negative bacteria. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2002 3(2): 77–98.

Rice LB. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of infectious diseases*. 2008. 197(8): 1079–81.

Riggs PJ, Chelius MK, Iniguez AL, Kaeppler SM, Triplett EW Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aust J Plant Physiol*. 2001. 28:829–836.

Romero L, Lopez L, Rodríguez-Baño J, Hernández JR, L. Martínez-Martínez L, and A. Pascual. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11: 625–631.

Rosenblueth M, Martínez L, Silva J, Martínez-Romero E. *Klebsiella variicola*, A novel species with clinical and plant-associated isolates. Systematic and Applied Microbiology. 2004. 27, 27-35

Sambrook J, Fritsch, EF, Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual, second edition (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) 1989.

Sarris PF, Zoumadakis C, Panopoulos NJ, Scoulica EV. Distribution of the putative type VI secretion system core genes in *Klebsiella* spp. Infection, genetics and evolution. 2011. 11(1): 157–66.

Seki M, Gotoh K, Nakamura S, Akeda Y, Yoshii T, Miyaguchi S, Inohara H, Horii T, Oishi K, Lida T, Tomono K. Fatal sepsis caused by an unusual *Klebsiella* species that was misidentified by an automated identification system. Journal of Medical Microbiology. 2013. 62, 801–803

Siebor E, Péchinot A, Duez J, Neuwirth C. One New LEN Enzyme and Two New OKP Enzymes in *Klebsiella pneumoniae* clinical Isolates and proposed nomenclature for chromosomal β -lactamases of this species. antimicrobial agents and chemotherapy. 2005, 49(7):3097.

Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. 2006. Microbiol Today 33, 152–155.

Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. 1994. Int J Syst Bacteriol 44,846– 849.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony. Mol Biol Evol. 2011 28(10):2731

Tenover, FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. American journal of infection control. 2006. 34(5 Suppl 1): S3–10 S64–73.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994 11;22(22):4673-80.

Thompson CC, Chimetto L, Edwards RA, Swings J, Stackebrandt E, Thompson FL. Microbial genomic taxonomy. 2013. *BMC Genomics.* 14:913.

Thompson S. Constructing and Refining Multiple Sequence Alignments with PileUp, SeqLab, and the GCG Suite. 2003. Chapter 3:Unit 3.6.

Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, Ludwig W, Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. 2010. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 249–266.

Tomasz A, Munoz R. β -lactam antibiotic resistance in gram positive bacteria pathogens of the upper respiratory tract: a brief overview of mechanisms. *Microbial Drug Resistance* 1995. 1:103-9.

Turton JF, Baklan H, Siu LK, Kaufmann ME, Pitt TL. Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella* sp. and comparison of isolates within these Serotypes. *FEMS Microbiol Lett* 2008. 284 247–252.

Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 2012. 40(15):e115

Wang M, Cao B, Yu Q, Liu L, Gao Q, Wang L, Feng L. Analysis of the 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer region in *Klebsiella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008. 46(11):3555.

Wayne, PA. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. 2012, Clinical and Laboratory Standards Institute. 11th Edition. CLSI document M02-A11.

Westbrook GL, Hara CMO, Susan B, Miller JM, Roman SB. Incidence and identification of *Klebsiella planticola* in clinical isolates with emphasis on newborns. J. Clin. Microbiol. 2000, 38(4):1495

Zollner-Schwetz I, Högenauer C, Joainig M, Weberhofer P, Gorkiewicz G, Valentin T, Hinterleitner TA, Krause R. Role of *Klebsiella oxytoca* in antibiotic-associated diarrhea. Clinical infectious diseases. 2008. 47(9):e74–8.