

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ILMD INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
Fiocruz Amazônia

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA
DA INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO**

NATÁLIA DE SOUZA RIBEIRO LOPES

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Klebsiella*
ORIUNDOS DE FEZES DE CRIANÇAS COM DIARREIA**

MANAUS

2019



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD
INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
Fiocruz Amazônia

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Klebsiella* ORIUNDOS DE FEZES DE CRIANÇAS COM DIARREIA

Dissertação de
Mestrado submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia da
Interação Patógeno Hospedeiro,
como requisito obrigatório para a
obtenção do título de Mestre em
Biologia da Interação Patógeno
Hospedeiro.

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi

Co-orientador: Prof. Dr. Gemilson Soares Pontes

**MANAUS - AM
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

L864c

Lopes, Natália de Souza Ribeiro

Caracterização de isolados de *Klebsiella* oriundos de fezes de crianças com diarreia. / Natália de Spouza Ribeiro Lopes. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

69 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Patrícia Puccinelli Orlandi.

Co-orientador: Prof. Dr. Gemilson Soares Pontes.

1. Doenças diarreicas 2. *Klebsiella* 3. Virulência I. Título

CDU 579.842.1/2 (811.3) (043.3)

CDD 579.34098113

22. ed.

Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos – CRB-11/ 28

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Klebsiella* ORIUNDOS DE FEZES DE CRIANÇAS COM DIARREIA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro.

Aprovada em: 08 de Agosto de 2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi - Orientador
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Prof. Dr. Vanderson Sampaio - Membro externo
Fundação de Medicina Tropical – Dr. Heitor Vieira Dourado – FMT-HDV

Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira - Membro interno
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

**MANAUS – AM
2019**

Este trabalho inteiramente aos meus amadíssimos pais

Solange de Souza Ribeiro Lopes

e Sidney da Silva Ribeiro Lopes,

à minha adorada irmã

Talita de Souza Ribeiro Lopes Dantas

e à minha adorável sobrinha

Isabela dos Santos Lopes

Aos meus queridos avós

Jurema Bomfim de Souza (In emoriam),

e Dario de Souza (In memoriam),

Luiza da Silva Ribeiro Lopes (In memoriam) e

Esterlito Ferreira Lopes (In memoriam).

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus e aos meus amigos espirituais que estão sempre ao meu lado intuindo e protegendo.

À minha Família amada por todo apoio, dedicação e confiança em mim.

Aos meus queridos amigos de Manaus que me apoiaram de todas as formas possíveis e inimagináveis nesta empreitada árdua, porém gratificante.

À minha Orientadora Patrícia Puccinelli Orlandi por ter me aceitado como sua aluna sem me conhecer e ter confiado no meu trabalho.

Ao meu Co-Orientador Gemilson Pontes por ter enriquecido meu trabalho com todo seu conhecimento.

A Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Deane - pela educação e pelo meu crescimento intelectual nestes anos de estudo e aprendizado.

Aos meus mestres Professores: MsC. Paula Taquira, Dr. Luiz André Mariúba, Dr. Maurício Ogusku, Dr. Diogo Castro, MsC. Antônio Balieiro, MsC. Victor Souza, MsC. Edilene Martins, MsC. Túllio Romão, MsC. Juliane Glória, MsC Jeniffer Clorives, a Ruth Moura e a Danielle Farias.

Aos Gestores e Funcionários do ILMD pela colaboração.

Aos técnicos do ILMD pelo apoio na realização dos experimentos.

À Fundação de Medicina Tropical (FMT) pelo espaço para finalizar os experimentos.

Ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) pelo espaço na realização de experimentos.

Aos colegas que tanto apoiaram emocionalmente ajudando na produção deste projeto.

A todos que participaram da finalização deste projeto de maneira direta ou indireta.

Gratíssima!

*“Estuda e não esmoreça, pois está erguida a cabeça
quem sempre cumpre o dever.*

*A vida é luta e batalha e nela quem só trabalha,
merece e deve vencer”*

Autor desconhecido

RESUMO

A *Klebsiella pneumoniae* é conhecida mundialmente pelo aparecimento de cepas multirresistentes, trazendo preocupação à comunidade médica e prejuízos à saúde pública com casos significativos de morbidade e mortalidade. Com novas ferramentas de biologia molecular foi possível diferenciar a *K.pneumoniae* em três grupos filogenéticos, questão: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola* e *Klebsiella quasipneumoniae*. Esta última subdividida em duas subespécies *similipneumoniae* e *quasipneumoniae*. Tanto a *K. quasipneumoniae* como a *K. variicola* são constantemente confundidas por serem estreitamente semelhantes filogeneticamente com a *K.pneumoniae*. Para obtermos dados epidemiológicos de enteropatógenos na região Norte do Brasil, iniciamos um estudo que compreendeu isolados de fezes diarreicas de crianças de 0-12 anos dos estados do Amazonas e Rondônia nos anos de 2007 a 2012. Um *screening* molecular das amostras foi realizado utilizando o gene SHV-Kvar, evidenciando o gênero *Klebsiella* sp. em 23 isolados. Quanto as espécies, *K.quasipneumoniae* foi a mais identificada (n=11), seguida de *K.variicola* (n=5), *K.pneumoniae* (n=2), e *Klebsiella* sp. (n=5). Quando analisados os fenótipos de virulência, a presença de formação de biofilme foi identificado em 20 isolados em diferentes graus de intensidade. Como o biofilme também é capaz de interferir na antibioticoterapia, estes isolados foram submetidos ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos onde, a exceção do isolado 158B, todos os isolados de *K. quasipneumoniae* apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico testado. Os isolados *K. quasipneumoniae* 125 (Manaus) e PV142 e PV146 (Porto Velho) apresentaram fenótipo de multirresistência MDR e altas taxas de aderência em célula HeLa. Na epidemiologia molecular, 4 grupos (A-D) com forte relação clonal foram identificados. Destacam-se a *K. quasipneumoniae* PV10800 e *K. quasipneumoniae* 138D pois estas amostras são de diferentes estados da região Norte coletadas em períodos distintos. Com a facilidade que a bactéria *Klebsiella* possui em transferir plasmídeos de resistência este dado é alarmante, e ressalta a necessidade de uma vigilância epidemiológica ativa e eficaz, com a capacidade de identificação correta de enteropatógenos de maneira clássica e, principalmente, molecular, antes de administração de antibioticoterapia.

Palavras Chave: Epidemiologia Molecular, Fenótipos de Virulência, Adesão Celular, MDR.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is known worldwide for multiresistant strains appearance, bringing concern to medical community and damage to public health with significant cases of morbidity and mortality. With new molecular biology tools it was possible to differentiate *K. pneumoniae* into three phylogenetic groups: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola* and *Klebsiella quasipneumoniae*. The last one was subdivided into two subspecies *similipneumoniae* and *quasipneumoniae* both *K. quasipneumoniae* and *K. variicola* are constantly missidentified due its closely phylogenetically similarity to *K. pneumoniae*. In order to obtain epidemiological enteropathogens data the north ernregion of Brazil, we initiated a study that comprised diarrheal stool isolates from children aged 0-12 years from the states of Amazonas and Rondônia during 2007 to 2012. A molecular screening of the samples was performed using SHV-Kvar gene, highlighting the genus *Klebsiella* sp. in 23 isolates. Regarding species, *K. quasipneumoniae* was the most identified (n=11), followed by *K. variicola* (n=5), *K. pneumoniae* (n=2), and *Klebsiella* sp. (n = 5). When analyzed virulence phenotypes, the presence of biofilm formation was identified in 20 isolates at different intensity degrees. As biofilm formation can also interfere in antibiotic therapy, these isolates underwent antimicrobial susceptibility testing where, with the exception of 158B isolate, all *K. quasipneumoniae* isolates were resistant to at least one antibiotic tested. The isolates *K. quasipneumoniae* 125 (Manaus) and PV142 and PV146 (PortoVelho) showed multiresistance phenotype (MDR) and high HeLa cell adhesion rates. In molecular epidemiology, 4 groups (A-D) with strong clonal relationship were identified. We highlight *K. quasipneumoniae* PV10800 and *K. quasipneumoniae* 138D once these samples are from different states of the northern region and, collected at different time periods. With the ability of transferring resistance plasmids, this data is alarming and emphasizes the need for active and effective epidemiological surveillance, with the ability to correctly identify enteropathogens in a classical and molecular manner before antibiotic therapy administration.

Keywords: Molecular Epidemiology, Virulence Phenotypes, Cellular Adhesion, MDR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ilustração esquemática dos cinco fatores de patogenicidade do gênero <i>Klebsiella</i>	18
Figura 2- Frequência de identidade de nucleotídeo obtido entre a <i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i> ; <i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> ; <i>K. variicola</i> e <i>K. pneumoniae</i>	20
Figura 3 - Comparação bioquímica entre espécies de <i>Klebsiella</i>	21
Figura 4 -Árvore filogenética baseada na concatenação de sequências nucleotídicas de cinco proteínas codificadas pelos genes <i>fusA</i> , <i>gapA</i> , <i>gyrA</i> , <i>leuS</i> e <i>rpoB</i>	22
Figura 5 -Visualização da adesão de <i>K. pneumoniae</i> em célula HeLa.....	26
Figura 6- Dendograma realizado com base no sequenciamento 16S rRNA.....	27
Figura 7 – 10 causas de morte globalem2015.	28
Figura 8 – Epidemiologia e etiologia da diarreia na infância.....	29
Figura 9 – Fluxograma das atividades.....	33
Figura 10 - Stringtest positivo.	38
Figura 11-Árvore filogenética das amostras estudadas quanto a similaridade do gene SHV- Kvar.....	44
Figura 12 - Porcentagem de resistência por família.....	42
Figura 13- Porcentagem de amostras multirresistentes (MDR).	42
Figura 14 - Teste de formação de biofilme em placa de poliestireno (96poços).....	43
Figura 15-Teste de formação de biofilme <i>invitro</i> . Realizado em placa de poliestireno de 96 poços. Linha vermelha: DO controle negativo, linha <i>cutoff</i> ; Linha azul: valor médio de DO.....	42
Figura 16 - Teste de adesão em célula HeLa. Setas indicam adesão dos isolados de <i>Klebsiella</i>	46
Figura 17- Similaridade genética por PFGE dos isolados do estudo. Amostras cortadas com enzima de restrição XbaI.	48

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Pesquisa sistemática no PUBMED sobre <i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	23
Tabela 2 - Sequência dos iniciadores utilizados neste estudo	35
Tabela 3 - Amostras isoladas e identificadas neste estudo	42
Tabela 4 - Tabela de suscetibilidade a antimicrobianos	38
Tabela 5 - Resultado do string test das amostras.....	43
Tabela 6 - Padrão de adesão dos isolados de <i>Klebsiella</i> in vitro em célula HeLa.....	45
Tabela 7 – Dados epidemiológicos das amostras estudadas.....	38
Tabela 8 – Resultados fenotípicos e genotípicos dos isolados estudados	38

ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
≥	Maior ou igual
AA	Adesãoagregativa
AAF	Fímbrias de aderência agregativa
DCDIA	Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia
DO	Densidade ótica
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FMT-HDV	Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
H	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
INPA	Instituto Nacional em Pesquisas da Amazônia
Kb	Kilobase
LATED	Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
LB	Luria Bertani
M	Molar
µg	Micrograma
mL	Mililitros
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTC	Nanotubos de carbono
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Ponto hidrogeniônico
Rpm	Rotações por minuto
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Gênero <i>Klebsiella</i>	18
2.2 <i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	20
2.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
2.4 Perfil de resistência à antimicrobianos	26
2.5 <i>Klebsiella</i> em processos diarreicos.....	28
3. JUSTIFICATIVA.....	31
4. OBJETIVOS.....	32
4.1 Objetivo Geral	32
4.2 Objetivos Específicos	32
5. MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1 Fluxograma das atividades	33
5.2 Isolamento, manutenção, estocagem e condições de cultivo bacteriano.....	33
5.3 Identificação Genotípica.....	34
5.3.1. Extração de DNA por choque térmico	34
5.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	35
5.3.3 Eletroforese em gel de agarose	35
5.3.4 Sequenciamento	36
5.4 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos	36
5.5 Teste de formação de biofilme	37
5.6 Stringtest.....	38
5.7 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	38
5.8 Teste de Adesão - HeLa <i>in vitro</i>	39
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.1 Identificação das amostras.....	41
6.2 Resistência a antimicrobianos	44
6.3 Biofilme.....	40
6.4 Stringtest.....	42
6.5 Cultura em células HeLa	44
6.6 Gel de Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE).....	46
6.7 Epidemiologia dos isolados	38
6.8 Potencial patogênico dos isolados estudados	40
CONCLUSÕES	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
9. ANEXOS.....	43

9.1	Anexo 1 - Comitê de Éticaem Pesquisa.....	43
9.2	Anexo 2 - Leiturameios bioquímicos	45
9.2.1	Meio EPM	45
9.2.2	Meio MILi	45
9.2.3	Citarto.....	45

INTRODUÇÃO

O gênero *Klebsiella* é constituído por espécies de grande importância médica, sendo responsáveis por frequentes casos de infecções hospitalares (ARENA et al., 2015). São enterobactérias bacilares, gram-negativas, não flageladas, anaeróbias facultativas e saprófitas, podendo ser encontrados no solo, água, plantas e esgoto, e conhecidas por colonizar o trato gastrointestinal e a nasofaringe de humanos e animais (BRISSE; VERHOEF, 2001).

Em 1875, Edwin Klebs descreveu a *Klebsiella pneumoniae* pela primeira vez examinando as vias aéreas de um paciente que foi a óbito por pneumonia. Mais tarde, em 1882, a espécie foi formalmente descrita por Carl Friedlander (LONG et al., 2017). Desde então, a *K. pneumoniae* se tornou a principal representante do gênero no mundo, sendo responsável por um grande número de infecções potencialmente fatais devido a habilidade de desenvolver mecanismos de resistência a antimicrobianos, principalmente entre recém-nascidos, imunocomprometidos e idosos (LONG, 2017).

O gênero é composto pelas espécies: *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella variicola*, *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella singaporensis*, *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella pneumoniae*, esta última possui três subespécies - *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* (ROSENBLUETH et al., 2004). Apesar da variedade de espécies conhecidas, novas espécies continuam sendo descobertas. Recentemente, duas novas espécies foram descritas: a *Klebsiella quasipneumoniae* (BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014) e a mais recente descrita, *Klebsiella grimontii* (PASSET; BRISSE, 2018).

De acordo com estudos de diversidade filogenética a *Klebsiella pneumoniae* é separada em filogrupos Kp1, Kp2, Kp4 e Kp3 e mais recentemente descritos os filogrupos Kp5 e Kp6 constituindo o complexo *Klebsiella pneumoniae*. Estes grupos filogenéticos são constituídos pelas espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* e *Klebsiella variicola*, respectivamente. Os filogrupos Kp5 e Kp6 são separados pelas linhagens CDC4241-71 (SB94) e 08A119 (SB 33) (BLIN et al., 2017), esta última nomeada *Klebsiella quasivariicola* (RODRIGUES et al., 2018).

A habilidade da *Klebsiella pneumoniae*, e das outras espécies do seu complexo, de realizarem recombinação cromossomal e de conjugação, aumenta seu conjunto de fatores de virulência e de genes de resistência antimicrobiano (LONG et al., 2017).

Os carbapanêmicos, que pertencem à classe dos antibióticos β -lactâmicos, são considerados o último recurso para o tratamento de pneumonia, bacteremia e infecções em pacientes recém-nascidos. O surgimento destas cepas de *K. pneumoniae* resistente aos carbapanêmicos é um grave problema de saúde pública, pois pode levar o paciente à óbito por ausência de opções terapêuticas (GOALS e GOALS, 2018).

Apesar de isolada com maior prevalência no trato respiratório de pacientes hospitalizados com pneumonia, casos de isolamento de *Klebsiella pneumoniae* em infecções no sangue já foram descritos (MARRA et al., 2006). Existem, ainda, notificações de casos de diarreia e diarreia sanguinolenta ligadas a duas espécies que são comensais do trato gastrointestinal a *K. oxytoca* e *K. pneumoniae*, respectivamente (GUERIN et al., 1998; CHENG et al., 2012). São conhecidos o genoma completo da *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* isolada de infecção no sangue (ARENA et al., 2015) e a presença desta mesma subespécie com característica hipervirulenta presente em um abscesso no fígado (GARZA-RAMOS et al., 2016). Sua associação com doenças do trato gastrointestinal, porém, até o presente momento, não foi realizada.

Durante os anos de 2007 a 2012, foram realizadas coletas pelo grupo Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia, DCDIA, Fiocruz, Manaus, AM, que totalizaram 1339 amostras de fezes diarreicas provenientes de crianças de 0-10 anos atendidas em hospitais públicos de Manaus (AM) (CRUZ et al., 2014). Em 2008, na Fiocruz Rondônia (RO), foram coletadas amostras de fezes diarreicas de crianças de 0-12 anos com a mesma finalidade da coleta de Manaus. Estes estudos almejavam compilar informações das análises laboratoriais de enteropatógenos destes estados para suprir a deficiência de dados epidemiológicos, utilizando ferramentas de epidemiologia molecular na identificação e monitoramento de espécies patogênicas de interesse médico. Os microrganismos isolados suspeitos de serem agente causal da doença diarreica passaram por triagem pela técnica de bioquímica clássica e foram inicialmente identificados como pertencentes ao gênero *Klebsiella* sp. Quanto a avaliação genotípica, a PCR do gene *ShvKvar* foi realizado, e os isolados que deram positivo para o gene testado foram sequenciados. Como resultados, foi revelado a presença das espécies *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella variicola*.

Acreditamos que pesquisas como esta são importantes para o conhecimento epidemiológico da doença diarreica no estado do Amazonas e de Rondônia. O relato da presença da *K. quasipneumoniae* na região Norte é inédita. Isto, associado ao fato que existem ainda poucos estudos publicados sobre esta espécie, que nos leva a questionar os aspectos de sua virulência e patogênese que ainda serão estudados.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gênero *Klebsiella*

As espécies do gênero *Klebsiella* pertencem à família Enterobacteriaceae, sendo bacilos gram-negativos, anaeróbicos facultativos, oxidase-negativos e desprovidos de flagelo. Amplamente difundida na natureza, estas bactérias são ubíquas e podem ser encontradas na água, esgoto, solo e plantas, além de colonizar a mucosa de mamíferos como humanos, cavalos e suínos. Estes microrganismos apresentam uma grossa camada de cápsula polissacarídica responsável pela hipermucoviscosidade que permite que estas bactérias evadam alguns mecanismos de defesa do hospedeiro, como por exemplo, a fagocitose (ULLMANN, 1998).

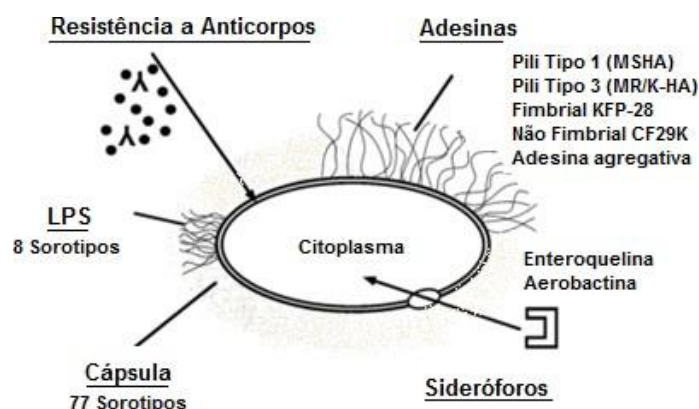


Figura 1- Ilustração esquemática dos cinco fatores de patogenicidade do gênero *Klebsiella*.
Fonte: **Adaptado de ULLMANN, 1998.**

Sua descoberta ocorreu antes do advento da técnica de coloração de Gram (1984). A primeira *Klebsiella* descrita foi um bacilo encapsulado isolado de pacientes com rinoscleroma por Von Frisch em 1882. Também em 1882, o patologista alemão Karl Friedländer relatou um bacilo encapsulado isolado dos pulmões como a causa da morte de pacientes com pneumonia, sendo esta bactéria conhecida como bacilo de Friedländer (PERLMAN, 1941). Esta bactéria foi nomeada de "*Hyalococcus pneumoniae*" por Schroeter em 1889. Posteriormente, Trevisan em 1885, renomeou estes bacilos para *Klebsiella* em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs (BRISSE; GRIMONT; GRIMONT, 2006) e o bacilo de Friedländer foi denominado para *Klebsiella pneumoniae* por Trevisan em 1887.

As espécies que compõem o gênero são *Klebsiella pneumoniae* com três subespécies (*K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*), a *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella variicola*, *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella singaporensis*, *Klebsiella michiganensis* (ROSENBLUETH et al., 2004). Recentemente duas novas espécies foram descritas, a *Klebsiella quasipneumoniae* (BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014) e *Klebsiella grimontii* (PASSET; BRISSE, 2018).

Bactérias do gênero *Klebsiella* são consideradas comensais do intestino humano e de animais homeotérmicos, mas tornam-se patogênicas quando adquirem genes de virulência através de bacteriófagos, plasmídeos ou ilhas de patogenicidade (OLIVEIRA et al., 2011). Este gênero pode causar vários tipos de infecções e têm sido associadas à pneumonia, infecções no trato urinário e respiratório (ULLMANN, 1998), além de ser encontrado colonizando feridas na pele (MONIÉ et al., 2014) e em casos de diarreia e desintéria (GUERIN et al., 1998).

Para identificação das espécies de *Klebsiella* como agentes causadores de infecção, são realizados métodos fenotípicos e genotípicos. Os métodos fenotípicos abrangem tipagem por fagos, por bacteriocina e sorotipagem. A sorotipagem do antígeno capsular é útil para epidemiologia no longo prazo, mas não reflete com exatidão as semelhanças genéticas entre os isolados (DIANCOURT et al., 2005). Dentre os métodos genotípicos, temos o sequenciamento de 16S rRNA (*rrs*), a análise de sequência multilocus baseado nos genes *rpoB*, *fusA*, *gapA*, *gyrA* e *leuS* e frequência de identidade de nucleotídeo (BRISSE; PASSET; GRIMON, 2014). Em surtos hospitalares, a caracterização epidemiológica ocorre por métodos moleculares como amplificação do DNA randômico polimórfico (RAPD), gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE) e polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado (RFLP) (DIANCOURT et al., 2005).

Contudo, as metodologias disponíveis na rotina laboratorial são limitadas, e os erros são frequentes na identificação destes microrganismos por não conseguirem diferenciar todos os filogrupos. Por isso, o desenvolvimento de métodos de baixo custo e de rápida identificação são importantes para dissociar os membros do complexo *Klebsiella pneumoniae*. Atualmente, a técnica de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), seguida pela detecção em um analisador do tipo de voo (TOF), é o método de primeira linha para identificação das espécies em laboratórios clínicos, ambientais e de microbiologia de alimentos (RODRIGUES et al., 2018).

2.2 *Klebsiella quasipneumoniae*

Em 1997, foi isolada de cultura de sangue de paciente austríaco uma bactéria (SB11) atribuída ao grupo filogenético *Klebsiella pneumoniae* KpII e KpII-A, devido a características gerais do gênero *Klebsiella*. Entre os anos de 2004 a 2013, três novas espécies de *Klebsiella* foram descritas: *K. variicola*, *K. singaporensis* e *K. michiganensis*, por isso, Brisse e colaboradores (2014) realizaram estudos como objetivo de caracterizar este isolado frente a *K. pneumoniae* e atualizar a taxonomia do gênero. Neste estudo, a nova espécie *Klebsiella quasipneumoniae* foi descrita (BRISSE; PASSET; GRIMON, 2014).

Esta nova espécie foi subdividida em duas subespécies: *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* e *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, que contêm cerca de 96% de frequência de identidade de nucleotídeos entre elas, além de aproximadamente 93% de similaridade com a *K. variicola* e *K. pneumoniae* (Figura 2) (BRISSE; PASSET; GRIMON, 2014).

Taxa: 1 *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. 01A030^T; 2, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov. 07A044^T; 3, *K. variicola* At-22; 4, *K. pneumoniae* DSM 30104^T.

Genoma	Tamanho (nct)	Conteúdo DNA C+G (mol%)	Frequência de identidade de nucleotídeos dos genomas testados contra os genomas			
			1	2	3	4
1	5 465 736	55.88	–	96.39	93.09	93.34
2	5 109 717	57.84	96.49	–	93.44	93.6
3	5 641 239	57.3	93.18	93.39	–	94.29
4	5 234 536	54.6	93.37	93.56	94.30	–

Figura 2- Frequência de identidade de nucleotídeo obtido entre a *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*; *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*; *K. variicola* e *K. pneumoniae*. **Fonte:** adaptado de BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014.

A *K. quasipneumoniae* era anteriormente identificada como *K. pneumoniae* e *K. variicola* devido à similaridade genética (FONSECA et al., 2017). Quanto a caracterização bioquímica, a *Klebsiella quasipneumoniae* possui características bioquímicas diferentes na produção de adonitol, L-sorbose e utilização de 3-fenilpropionato, que pode ter entre 20% e 30% de isolados positivos (Figura 3) (BRISSE; PASSET; GRIMON, 2014), porém, devido a esta variação de positividade, esta espécie também pode ser confundida bioquimicamente com a *K. pneumoniae* e *K. variicola*.

Taxa: 1, *K. quasipneumoniae* sp. nov. ; 2, *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov.; 3, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov.; 4, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*; 5, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*; 6, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*; 7, *K. variicola*. -, Menos de 20% dos isolados positivos; +, Mais de 80% dos isolados positivos; d, entre 20% e 80% dos isolados positivos.

	1	2	3	4	5	6	7
Hidrólise de Ureia	+	+	+	+	-	-	+
Teste ONPG	+	+	+	+	+	-	+
Teste Voges-Proskauer	+	+	+	+	-	-	+
Teste Malonato	+	+	+	+	-	+	+
Descarboxilação de Lisina	+	+	+	+	d	-	+
Produção de Ácido de:							
Adonitol	d	d	+	+	+	+	-
L-Sorbose	d	d	-	-	-	-	+
Utilização de:							
3-fenilpropionato	d	d	-	-	-	-	-
5-ceto-D-gluconato	-	-	-	-	-	-	+
Ácido Tricarbalítico	+	+	+	-	-	-	+

Figura 3 - Comparação bioquímica entre espécies de *Klebsiella*.
Fonte: adaptado de BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014.

Quando avaliados a filogenia destas bactérias quanto aos genes KpII-A e KpII-B, as espécies de *Klebsiella quasipneumoniae* dividem um ancestral em comum com a *Klebsiella pneumoniae*. A *K. pneumoniae* e *K. variicola* diferem em porcentagem de nucleotídeos por 97,6% e 96,6%, respectivamente, revelando que a diferença na sequência nucleotídica entre as duas espécies é de 1% (Figura 4) (BRISSE; PASSET; GRIMON, 2014).

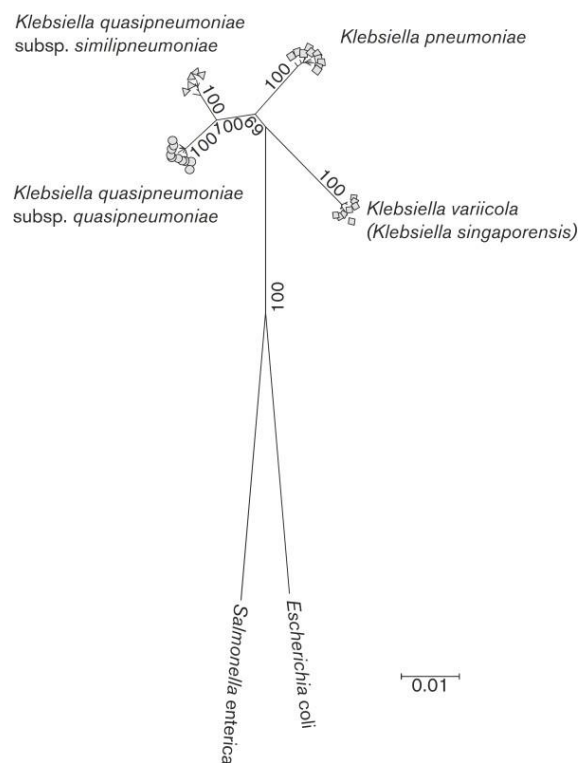


Figura 4 -Árvore filogenética baseada na concatenação de seqüências nucleotídicas de cinco proteínas codificadas pelos genes *fusA*, *gapA*, *gyrA*, *leuS* e *rpoB*.

Fonte: BRISSE; PASSET; GRIMONT,2014.

Dentre as subespécies de *Klebsiella quasipneumoniae*, a *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* e a *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* são consideradas espécies irmãs com 97,8% desimilaridade (BRISSE; PASSET; GRIMON, 2014). Atualmente, mais relatos desta espécie têm sido publicados. A cepa MB373 *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* foi descrita como possível biomarcador de ambientes contaminados, contendo genes ligados a degradação de xenobióticos, de compostos orgânicos e a resistência a metais pesados e antibióticos (ASLAM; YASMIN; THOMAS,2016).

Pouco se sabe sobre o potencial patogênico desta espécie, porém, ela é considerada de baixo potencial patogênico, comensal, podendo tornar-se oportunista. No entanto, dois casos merecem destaque: o isolado hipervirulento de *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (FI_HV_2014) de um paciente peruano com infecção no sangue e no trato biliar, foi caracterizada como o primeiro fenótipo de hiper mucoviscosidade (ARENA et al., 2015) o isolado hipervirulento (ST2320) de *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* de paciente com septicemia causada por fascíte necrosante (SHANKAR et al., 2017).

Em uma revisão sistematizada realizada no mês de julho de 2019, foram submetidos a plataforma PUBMED os termos “*Klebsiella quasipneumoniae*”; “*Klebsiella quasipneumoniae*” + “Child”; e “*Klebsiella quasipneumoniae*” + ”Diarrhoea”. Para o primeiro termo foram recuperados 33 artigos, sendo que 18 deles foram publicados entre os anos de 2018 e 2019. Para o segundo, apenas um artigo. Para o último, nenhum retorno foi encontrado (Tabela1).

Tabela 1 – Pesquisa sistematizada no PUBMED sobre *Klebsiella quasipneumoniae*

ARTIGOS REFERENTES AO TERMO "KLEBSIELLA QUASIPNEUMONIAE"	AUTOR	ANO
High colonization rate of a novel carbapenem-resistant <i>Klebsiella</i> lineage among migratory birds at Qinghai Lake, China.	Liao X et al.	2019
Emergence of mcr-8.2-bearing <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> of animal origin.	Yang X et al	2019
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> Provides a Window into Carbapenemase Gene Transfer, Plasmid Rearrangements, and Patient Interactions with the Hospital Environment.	Mathers AJ et al.	2019
Emergence of New Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM-5) in <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> from Neonates in a Nigerian Hospital.	Brinkac LM et al.	2019
Membrane Fouling Potentials of an Exoelectrogenic Fouling-Causing Bacterium Cultured With Different External Electron Acceptors.	Ishizaki S et al.	2019
Molecular Characterization of Carbapenem Resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> Isolated from Lebanon.	Arabaghian H et al	2019
First Report of Whole-Genome Sequence of Colistin-Resistant <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> Producing KPC-9 in India.	Shankar C et al.	2019
Identification of <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> , <i>Klebsiella variicola</i> and Related Phylogroups by MALDI-TOF Mass Spectrometry.	Rodrigues C et al	2018
Population Structure, Antibiotic Resistance, and Uropathogenicity of <i>Klebsiella variicola</i> .	Potter RF et al.	2018
Carbapenem-resistant Isolates of the <i>Klebsiella pneumoniae</i> Complex in Western China: The Common ST11 and the Surprising Hospital-specific Types.	Liu L et al.	2018
Complete Genome Sequence of <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> Strain S05, a Fouling-Causing Bacterium Isolated from a Membrane Bioreactor.	Kitajima M et al.	2018
Genome misclassification of <i>Klebsiella variicola</i> and <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> isolated from plants, animals and humans.	Martínez-Romero E et al.	2018
Whole Genome Sequence Analysis of CTX-M-15 Producing <i>Klebsiella</i> Isolates Allowed Dissecting a Polyclonal Outbreak Scenario.	Becker L et al.	2018
Comparative Genomic Analysis of a Clinical Isolate of <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> , a KPC-2 and OKP-B-6 Beta-Lactamases Producer Harboring Two Drug-Resistance Plasmids from Southeast Brazil.	Nicolás MF et al.	2018
Characteristics of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Wastewater Revealed by Genomic Analysis.	Gomi R et al	2018
Colonization, Infection, and the Accessory Genome of <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	Martin RM et al.	2018
Draft genome sequence of CTX-M-type β -lactamase-producing <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> isolated from a Box turtle.	Li CF et al.	2018
Tigecycline Susceptibility of <i>Klebsiella pneumoniae</i> Complex and <i>Escherichia coli</i> Isolates from Companion Animals: The Prevalence of Tigecycline-Nonsusceptible <i>K. pneumoniae</i> Complex, Including Internationally Expanding Human Pathogenic Lineages.	Sato T et al.	2018
Characterization and Antibiotic Sensitivity Profile of Bacteria in Orofacial Abscesses of Odontogenic Origin.	Jagadish Chandra H et al.	2017
Whole-Genome Sequences of Two Carbapenem-Resistant <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> Strains Isolated from a Tertiary Hospital in Johor, Malaysia.	Gan HM et al.	2017
Whole-Genome Sequencing of Human Clinical <i>Klebsiella pneumoniae</i> Isolates Reveals Misidentification and Misunderstandings of <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella variicola</i> , and <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> .	Long SW et al.	2017

Draft genome of a hypervirulent <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> with novel sequence type ST2320 isolated from a chronic liver disease patient.	Shankar C et al.	2017
A one-step multiplex PCR to identify <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella variicola</i> , and <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> in the clinical routine.	Fonseca EL et al.	2017
Genome Sequence of <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> MB373, an Effective Bioremediator.	Aslam F et al.	2016
Draft Genome Sequence of a Hyper-mucoviscous Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> Clinical Isolate.	Garza-Ramos U et al.	2016
Complete Genome Sequence of <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> Strain ATCC 700603.	Elliott AG et al.	2016
Draft Genome Sequence of a Multidrug-Resistant <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> Isolate from a Clinical Source.	Ozer EA et al.	2016
<i>Klebsiella alba</i> is a later heterotypic synonym of <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> .	Li CY et al.	2016
Liver Abscess Caused by Infection with Community-Acquired <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i> .	Breurec S et al.	2016
Genomic identification of nitrogen-fixing <i>Klebsiella variicola</i> , <i>K. pneumoniae</i> and <i>K. quasipneumoniae</i> .	Chen M et al.	2016
Draft Genome Sequence of the First Hyper-mucoviscous <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i> Isolate from a Bloodstream Infection.	Arena F et al.	2015
Description of <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i> subsp. nov. and <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> subsp. nov., and demonstration that <i>Klebsiella</i> <i>quasipneumoniae</i> is a junior heterotypic synonym of <i>Klebsiella variicola</i> .	Brisse S et al.	2014
ARTIGOS REFERENTES AO TERMO "KLEBSIELLA QUASIPNEUMONIAE" + "CRIANÇA"	AUTOR	ANO
Emergence of New Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM-5) in <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> from Neonates in a Nigerian Hospital.	Brinkac LM et al.	2019
ARTIGOS REFERENTES AO TERMO "KLEBSIELLA QUASIPNEUMONIAE" + "DIARREIA"	AUTOR	ANO
Nenhum artigo encontrado	-	-

K. quasipneumoniae foi inicialmente observada restritamente na agricultura e ambiente. Apesar disso, existe o indicativo desta bactéria causando doença em humanos, com a descrição de fatores de virulência ancorados e genes de resistência antimicrobiana adquiridos que são relevantes clinicamente. São poucos os relatos da evidência de *K. quasipneumoniae* porque ela é comumente confundida com a *K. pneumoniae* em testes de rotina de laboratórios (MAHTERS et al., 2019). Atualmente no mundo a transferência horizontal via plamídeo é a principal causa de resistência antimicrobiana de bactérias clinicamente relevantes. Sendo o esgoto hospitalar o reservatório ideal para a troca e amplificação de genes de resistência, com a constante pressão seletiva de antibióticos excretados em resíduos de pacientes (RODRIGUES et al., 2018).

2.3 *Klebsiella pneumoniae*

A *Klebsiella pneumoniae* é um microrganismo comensal do trato gastrointestinal e mucosa de animais de sangue quente como humanos, cavalos e suínos. A taxa de detecção ocorre na frequência de 5% a 38% nas fezes, e de 1% a 6% na nasofaringe.

Por se tratarem de organismos Gram-negativos, não apresentam bom crescimento na pele humana, ocorrendo uma transição rara dos membros desse gênero neste órgão (ULLMANN, 1998).

Dentre as espécies de *Klebsiella*, a *K. pneumoniae* destaca-se por ser o principal patógeno responsável por episódios de pneumonia, infecções uropatogênicas, do trato biliar, osteomielites e bacteremia, principalmente em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) (SHON; BAJWA; RUSSO, 2013). Sendo considerada a principal causa de infecção hospitalar, tornando esta espécie a de maior importância do ponto de vista médico para humanos. (ULLMANN, 1998; CELI, 2018). Entretanto, destaca-se um caso de uma paciente com diarreia sanguinolenta causada por *K. pneumoniae*. Guerin e colaboradores (1998) descreveram uma paciente idosa com ausência de comprometimento imune, soro negativo para o vírus HIV, análises parasitológicas negativas, testes para Adenovírus e Rotavírus negativos. A coprocultura foi positiva apenas para *Klebsiella pneumoniae*. O estudo sugeriu que *K. pneumoniae* pudesse ser a provável causa da diarreia observada (GUERIN et al.,1998). As cepas consideradas diarreio gênicas de *K. pneumoniae* codificam citotoxinas que induzem alterações morfológicas em célula quando avaliada a invasão por cultura de células *in vitro*.

Na figura 5A, a seta indica a coloração de Giemsa com adesão de *K. pneumoniae* em célula HeLa. Na figura 5B, a seta indica coloração por Isotiocianato de Fluoresceína colorindo a actina filamentosa de célula HeLa infectada com *K. pneumoniae* (GUERIN et al.,1998).

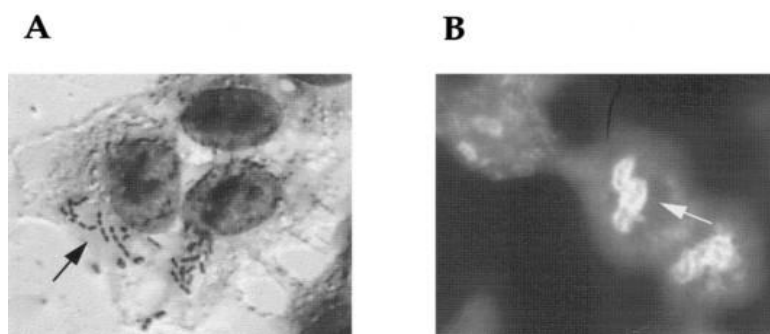


Figura 5 -Visualização da adesão de *K. pneumoniae* em célula HeLa.

Fonte: GUERIN et al., 1998

2.4 Perfil de resistência à antimicrobianos

Nos últimos anos, surtos relacionados a linhagens multirresistentes têm sido frequentes, em especial em UTIs e alas pediátricas de hospitais em todo o mundo, dificultando o tratamento dos indivíduos afetados (ROMERO et al., 2007). A *Klebsiella* foi considerada o bacilo Gram-negativo multirresistente mais frequente nestes surtos (HENDRIK; VOOR IN 'T HOLT; VOS, 2015), sendo os mecanismos de resistência um de seus maiores fatores de virulência.

A produção de enzimas β -lactamases de amplo espectro (ESBL) destacam-se por estarem amplamente distribuídas entre as espécies do gênero *Klebsiella*. Essas enzimas, codificadas por plasmídeos, são resultantes da mutação do gene da β -lactamase comum, como o TEM-1, TEM-2 e SHV-1. Dentre seus espectros de ação, um dos principais é a capacidade de hidrolisar uma ampla variedade de penicilinas e cefalosporinas de terceira geração, as quais foram originalmente desenvolvidas como drogas capazes de vencer a resistência bacteriana conferida pelas β -lactamases comuns (OLIVEIRA et al., 2011). Com o surgimento de cepas multirresistentes, mais de 200 tipos diferentes de enzimas ESBL são classificadas pelos grupos de genes TEM, SHV, CTX-M, OXA (ROMERO et al., 2007). No gênero *Klebsiella*, a *Klebsiella pneumoniae* é considerada a principal espécie patogênica, fazendo parte do grupo que causam infecções nosocomiais no mundo, o “ESKAPE”: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, e *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp. Além de infecções hospitalares, este grupo é conhecido possuir resistência aos antibióticos β -lactâmicos (RICE, 2008). A resistência bacteriana é uma das importantes ameaças globais. Em 2018, o Sistema de Vigilância Antimicrobiana Global (GLASS) da Organização Mundial de Saúde (OMS) notificou a ocorrência generalizada de infecções bacterianas com resistência e multirresistência aos antibióticos em aproximadamente 500 mil distribuídas em 22 países.

As bactérias resistentes mais frequentemente relatadas foram *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, seguidas de *Salmonella* spp. (GHEBREYESUS, 2018). No Brasil, foram relatados casos resistência à carbapenemase por *Klebsiella pneumoniae* (KPC) nas cidades do Rio de Janeiro, Recife, São Paulo, Porto Alegre e Paraíba (GONTIJO-FILHO; GALES, 2012). Os isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* são naturalmente resistentes a ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina, devido a expressão constitutiva de cromossomos que codificam a β -lactamases comuns (OZERetal., 2016). Os genes cromossômicos bla_{SHV}, bla_{OKP-A/ blaOKP-B}, e bla_{LEN} pertencem a famílias β -lactamases de classe A e

dividem a *Klebsiella pneumoniae* em três grupos filogenéticos: KpI, KpII-A/ KpII-B, and KpIII (FEVRE et al., 2005) baseada na sequência do gene 16S (Figura 6). Recentemente, estes grupos foram correlacionados às espécies *K. pneumoniae* (KpI), *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (KpII-A) *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (KpII-B) e *Klebsiella variicola* (KpIII) (Figura 6) (FONSECA et al., 2017).

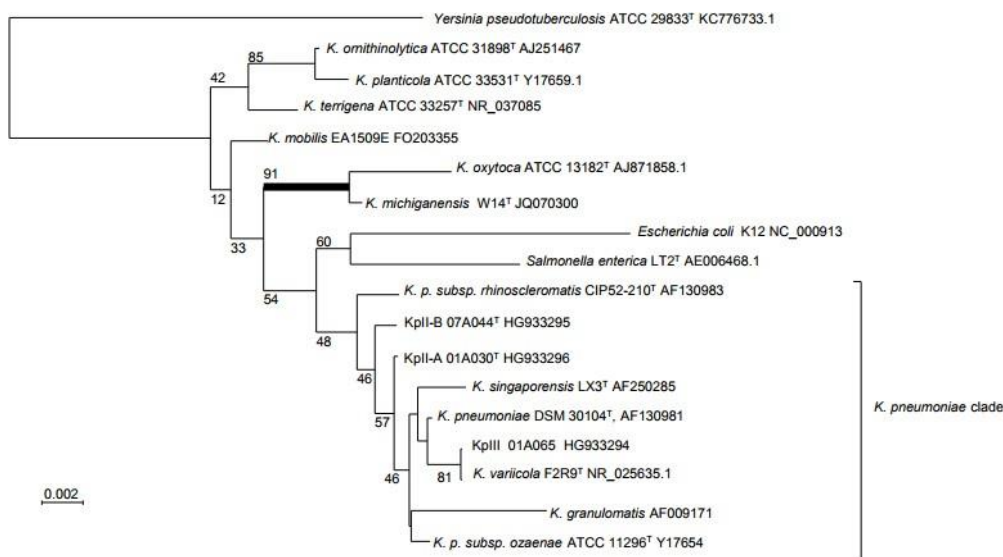


Figura 6- Dendrograma realizado com base no sequenciamento 16S rRNA.

Fonte: BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014.

2.5 *Klebsiella* em processos diarreicos

A doença diarreica de origem infecciosa é, ainda nos dias atuais, uma síndrome frequente, estando entre as principais causas morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento (OZER et al., 2016). De acordo com a OMS, define-se como diarreia a dejeção de fezes líquidas por mais de 3 dias, ou mais frequente do que o usual para o indivíduo. As causas são geralmente de infecção gastrointestinal, que pode ser ocasionada por uma variedade de bactérias, vírus ou parasitos. A infecção ocorre por meio da ingestão de comida ou água contaminadas e de pessoa para pessoa (WHO, 2017).

A diarreia grave leva à perda de líquidos podendo ser fatal, especialmente em crianças pequenas e pessoas desnutridas ou imunocomprometidas (FOX, 2011). No mundo, aproximadamente 361 mil crianças com menos de 5 anos de idade vão a óbito todos os anos devido as doenças diarreicas (OSSEIRAN; CHIRSCADEN, 2017), estando entre as 10 maiores causas de mortes globais da OMS (YORK et al., 2018) (Figura7).

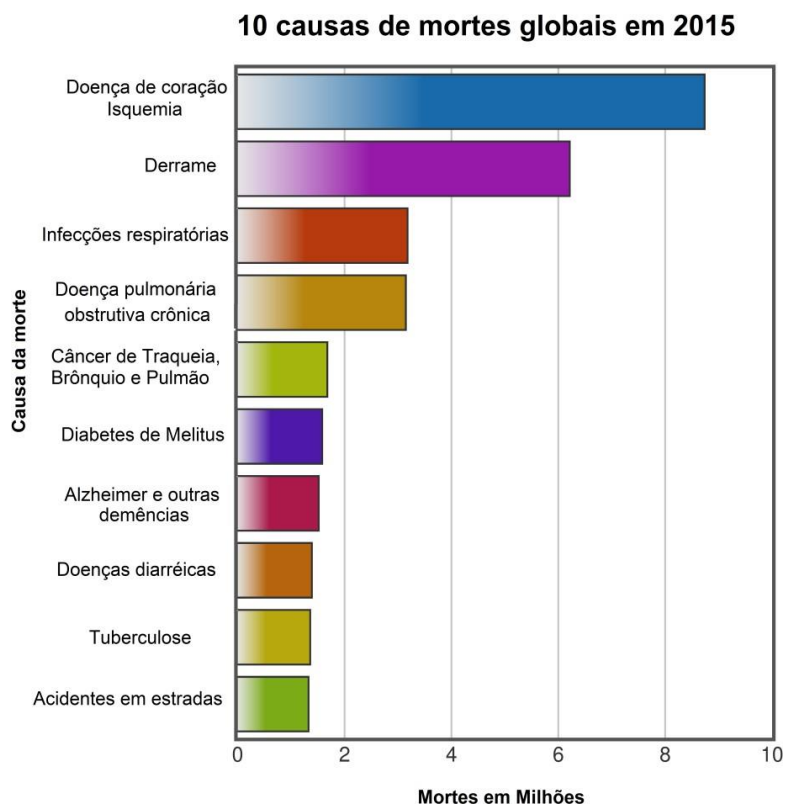
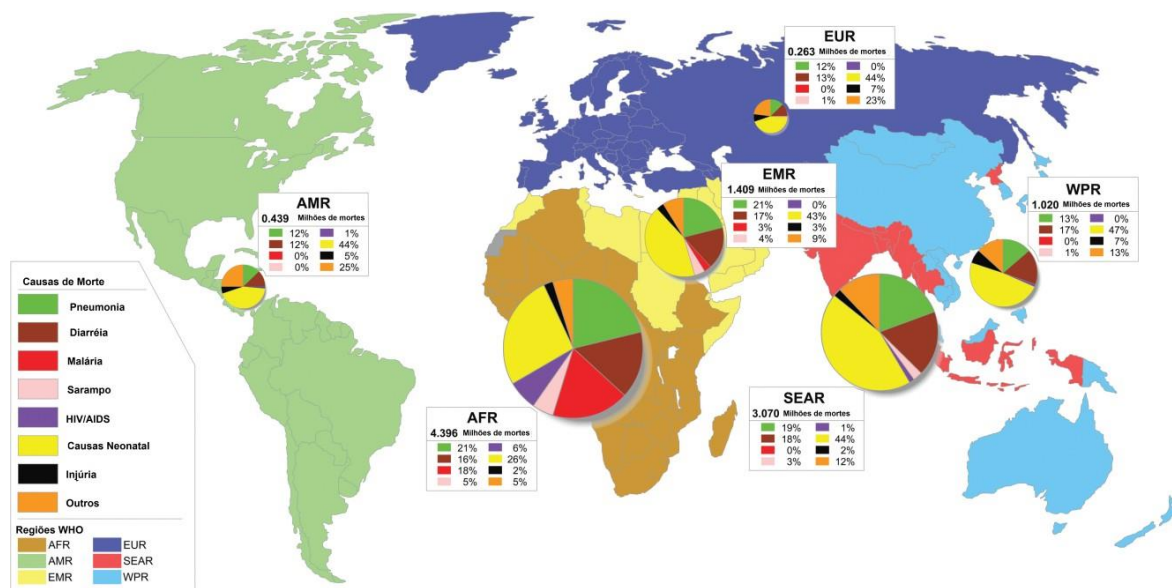


Figura 7 – 10 causas de morte global em 2015.

Fonte: adaptado de OMS, 2017.

O boletim epidemiológico da OMS (2008), mostra a distribuição de mortes por diarreia em crianças abaixo de 5anos de idade. Nas américas, das 400 milhões de mortes que ocorreram em 2008, 12% puderam ser atribuídas as doenças diarreicas (Figura 8) (RUDAN; BOSCHI-PINTO; BILOGLAV, 2008).



AFR, Região Africana; AMR Região das Américas; EMR Região do Mediterrâneo Oriental; EUR, Região Européia; SEAR, Região do Sudeste da Ásia; WPR; Região do Pacífico Ocidental

Figura 8 – Epidemiologia e etiologia da diarreia na infância.

Fonte: Adaptado de RUDAN, 2008.

Apesar de as espécies de *Klebsiella* spp. estarem comumente associadas a infecções hospitalares (ROMERO et al., 2007), existem associações destas com casos de diarreia. Isolados de *Klebsiella pneumoniae* já foram relatados em fezes sanguinolentas (GUERIN et al., 1998) e a *Klebsiella oxytoca* em um caso de colite hemorrágica no Japão (YAMADA et al., 2014). Um estudo realizado em pacientes de Hong Kong, China, demonstrou que a *K. oxytoca* foi a responsável por 73,1% dos casos de diarreia sem a presença de nenhum outro patógeno associado (YAMADA et al., 2014).

A *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* pode causar doenças em humanos, mas é considerada menos patogênica (BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014). No entanto, já foram reportadas a presença desta subespécie em doenças humanas graves como septicemia (ARENA et al., 2015), em abscessos no fígado (BREUREC et al., 2016) e em linfoma cecal obstrutivo (OZER et al., 2016). Porém, até o momento, não há casos relatados desta espécie como possível agente causador de diarreia.

3. JUSTIFICATIVA

Cruz e colaboradores em 2014 identificaram a *Klebsiella quasipneumoniae* e por se tratar de uma bactéria recentemente descrita, pouco se sabe sobre seu mecanismo de patogênese (BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014), porém esta já foi associada com infecções no sangue (ARENA et al., 2015) e em um abscesso no fígado (GARZARAMOS et al., 2016). Uma vez que há a associação da *K. pneumoniae* a doenças gastrointestinais (CHENG et al., 2012), e que a *K. quasipneumoniae* possui relação filogenética com a *K. pneumoniae* (BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014).

O grupo de DCDIA acredita que pesquisas como esta são importantes para o conhecimento epidemiológico da doença diarreica na região Norte. A caracterização bioquímica, molecular e de resistência aos antimicrobianos da *Klebsiella quasipneumoniae* encontrada no Norte do país. Isto, associado ao fato que existem ainda poucos estudos sobre esta espécie publicados, nos leva a questionar os aspectos de sua virulência e patogênese que ainda serão estudados, como intuito de fornecer diagnóstico e tratamento corretos para os indivíduos acometidos pela enfermidade.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Caracterizar os isolados de *Klebsiella quasipneumoniae* oriundos das fezes de crianças atendidas nos hospitais infantis de Porto Velho (RO) e Manaus (AM) quanto seu potencial patogênico.

4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil de resistência fenotípico de isolados *Klebsiella quasipneumoniae*;
- Determinar ferramenta de molecular o perfil de similaridade genética dos isolados;
- Verificar a habilidade adesiva dos isolados de *Klebsiella quasipneumoniae in vitro*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Fluxograma das atividades

Este estudo consistiu em duas etapas: a caracterização microbiológica clássica e a molecular (Figura 9).

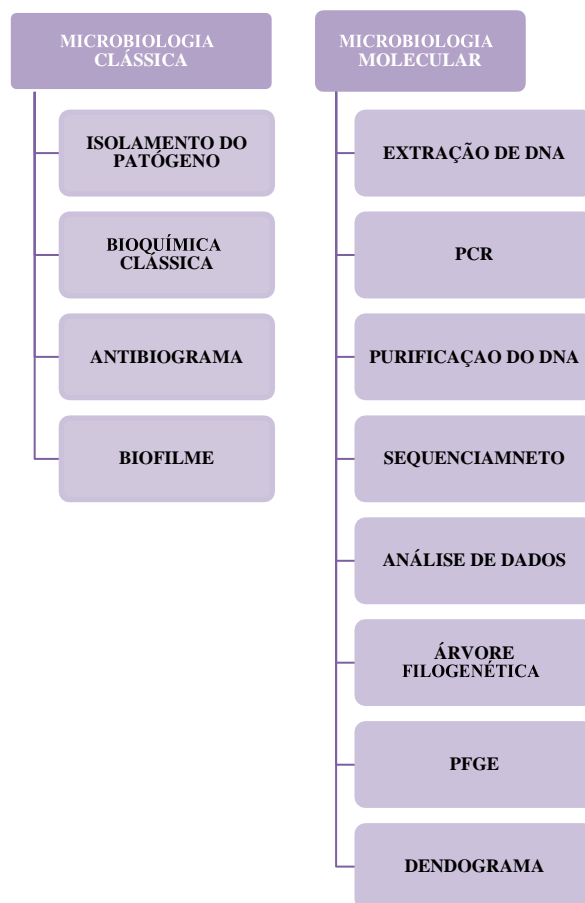


Figura 9 - Fluxograma das atividades.

5.2 Isolamento, manutenção, estocagem e condições de cultivo bacteriano

Um total de 198 isolados, sendo 163 da cidade de Manaus (AM) e 34 de Porto Velho (RO) coletados durante o período que compreende os anos de 2007 a 2012 nos hospitais públicos infantis destas cidades e analisados no Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia (DCDIA), do Instituto Lêonidas em Maria Deane, Fiocruz, Amazônia, Brasil, foram utilizados neste estudo. A triagem das amostras de diarreia foi realizada por bioquímica clássica e as enterobactérias presentes foram isoladas. *Klebsiella* sp. foi um dos microrganismos encontrados no ensaio presuntivo e mantidas em meio definitivo para sua conservação.

Foram apreciadas e aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas–UFAM, sob o Protocolo No.266/ 2006, em reunião ocorrida em 15 de março de 2007(ANEXO1).

Para a realização deste estudo, foram reativados a partir da cultura em meio mínimo, inoculado em 3 ml de Caldo Tripto Caseína de Soja e incubadas a 37° C por 16/18 horas. Após este período, este crescido foi semeado em placas contendo o meio seletivo diferencial Ágar MacConkey (HiMedia, Mumbai, Índia) e novamente incubado a 37°C por 16-18 horas. Para a confirmação da pureza da amostra, uma colônia isolada com característica morfológica para *Klebsiella* sp. (Lactose positiva, mucoide, brilhante, bordas regulares, de 3 a 4mm) foi inoculada em galeria bioquímica para enterobactérias – EPM, MILi, Citrato - para a visualização da produção de gás, produção de sulfeto de hidrogênio, de glicose, capacidade de motilidade e produção de indol, utilização de citrato como única fonte de carbono e metabolização de ureia (ANEXO2).

A identificação do gênero por método bioquímico ocorreu seguindo os parâmetros utilizados pela plataforma de identificação bacteriana online ABBIS (disponível em <http://www.tgw1916.net/intro.html>). As colônias com características bioquímicas compatíveis com *Klebsiella* sp. tiveram uma quantidade de massa celular retirada das colônias isoladas e armazenadas de duas formas: inoculação em meio mínimo para experimentos em andamento; e estocadas à -80°C, para utilização em experimentos futuros.

5.3 Identificação Genotípica

5.3.1. Extração de DNA por choquetérmico

Os isolados foram inoculados em tubos contendo 3mL de caldo Luria Bertani – LB(HiMedia) 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 solução 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 a suspensão foi levada ao banho-seco a 100°C por 10 minutos, sendo imediatamente submetida a uma temperatura de -20°C. Este material foi posteriormente descongelado à temperatura ambiente e centrifugado a 14.000 RPM por 15 segundos e o sobrenadante utilizado nas reações de PCR.

5.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os iniciadores utilizados na reação de PCR estão descritos na Tabela 2. Para a triagem do gênero *Klebsiella*, foram utilizados oligonucleotídeos já descritos na literatura, que amplificaram um fragmento de rDNA 16S, e para a identificação das espécies o iniciador foi SHVKvar. Para as ampliações, as reações foram incubadas a 95°C por 5 min, submetidas a 39 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 1 min. e 30 seg, e uma extensão final de 72°C por 10min.

A reações foram realizadas em termociclador (Veriti Thermal Cycler® PCR System 9700, Applied Biosystems). Os fragmentos de DNA foram visualizados por eletroforese em 80V/cm por 60 minutos em gel de agarose a 1,5% e corados por GelRed™. O registro das imagens foi feito em foto documentador Invitrogen™ iBright FL1000 Imager.

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores utilizados neste estudo

Iniciadores	Sequência nucleotídica (5' - 3')	Região amplificada	Referência
SHV KVAR F	GCTGAGGCTGGGCTAAATAT	Sequência completa de blaLEN	LGMM
SHV KVAR R	CCCCTGATGAGAACAAGGTT	Sequência completa de blaLEN	LGMM

5.3.3 Eletroforese em gel de agarose

Os géis foram preparados dissolvendo a agarose em tampão TBE 1X com a concentração final de 1%. Antes da polimerização, foi adicionado o corante GelRed®. Diferentes volumes foram aplicados no gel dependendo do experimento foram aplicados 7µL de produto de PCR. A corrida eletroforética foi feita em tampão de corrida TBE 1X sob uma corrente de aproximadamente 80 Volts por 45 a 90 minutos. Após a corrida, o gel foi observado sob luz ultravioleta e registrado em foto com o equipamento Invitrogen™ iBright FL1000 Imager.

5.3.4 Sequenciamento

A purificação dos *amplicons* gerados foi feita por precipitação com Polietilenoglicol (PEG), conforme (Humphreys et al., (1975), modificado por Naveca, et al., (2014)), que atua como método de purificação da PCR com o intuito de remover oligonucleotídeos não incorporados aos *amplicons* gerados a partir da PCR que podem interferir na reação do sequenciamento. A quantificação dos fragmentos de DNA foi realizada por espectrofotômetro UV/Vis da Thermo Scientific™, modelo Nano Drop™ 2000/2000c e as quantidades ajustadas para a reação de PCR (50-100µg/µl).

Em seguida, 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 ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde – PDTIS da FIOCRUZ. As análises das sequências foram realizadas com auxílio do programa de análise de sequências Geneious Prime versão 2019.2.1. As sequências foram comparadas àquelas depositadas no banco de sequências Genbank (NCBI).

5.4 Teste de susceptibilidade antimicrobianos

Os testes avaliaram os padrões de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* pelo método de difusão em disco, em placas contendo ágar de Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia), seguindo as diretrizes do manual do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). Cerca de cinco colônias com 24h de crescimento foram selecionadas em placa com meio LB ágar e suspensas em solução salina 0,85% estéril e a densidade óptica ajustada de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland. Com auxílio de um swab, a suspensão bacteriana foi riscada por toda a superfície do ágar de uma placa de Mueller Hinton, girando a placa 60° entre os riscos para obter uma inoculação uniforme. Depois de 5 minutos, foram aplicados discos impregnados de antimicrobianos (BioRad, Califórnia, USA). As placas foram incubadas a 37°C por 18h. Mediu-se o diâmetro dos halos de inibição completa. Os halos são medidos até o milímetro inteiro mais próximo e os diâmetros observados comparados com a tabela do (CLSI, 2015).

Os isolados bacterianos foram avaliados para os antimicrobianos: norfloxacin, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, gentamicina, amicacina, sulfametoxazol + trimetropim,

cefotaxima, ceftadizima, cefalotina, meropenem, imipinem, aztreonama, ampicilina. Quando a resistência envolve três ou mais classes de antimicrobianos, as bactérias são consideradas multirresistentes (MDR) (D'AGATA, 2004).

5.5 Teste de formação de biofilme

A formação do biofilme foi estimada pela habilidade das células bacterianas aderirem na cavidade de uma placa para cultivo de células de poliestireno de 96 poços (Corning, Costar). Em cada poço foi adicionado 100µl em caldo Lauria Bertania e 100µl de cada isolado de *Klebsiella* a $1,5 \times 10^8$ e incubadas à 30°C por 24h sem agitação. As células planctônicas foram retiradas e os poços com biofilme foram lavados três vezes com água destilada e foram acrescidos 200µl de cristal violeta (4% [peso/ volume]; Sigma-Aldrich) em cada poço, os quais ficaram por 15 minutos à temperatura ambiente por 20min. O excesso de corante foi removido com água destilada. 200µl de ácido acético (30% [peso/volume]; EMSURE®) foi adicionado e mantido a temperatura ambiente por 30 minutos. Na sequência, a densidade óptica (DO) foi mensurada a 600nm em leitor de microplacas por absorvância (Glomax® Discover Microplate Reader). Os ensaios foram realizados em triplicata para cada isolado e a média do desvio padrão foi relatada.

As cepas foram classificadas como não-aderente, fracas, moderadas ou fortes produtoras de biofilme, seguindo os critérios:

- $DO \leq$ controle negativo, sem produção de biofilme;
- $DO >$ abaixo da média total, produção fraca/moderada de biofilme;
- $DO >$ acima da média total, forte de biofilme.

As análises estatísticas foram realizadas como MsC. Antônio Balieiro no software estatístico R na versão 3.6.0, usando o Rstudio versão 1.1.4, com pacotes diversos (tidyverse e ggstatsplot). O nível de significância utilizado foi de 0.05.

5.6 Stringtest

O string teste é uma triagem fenotípica que verifica o fenótipo de hiper mucoviscosidade. Os isolados foram inoculados em tubos contendo 3mL de caldo Luria Bertani – LB (HiMedia) e incubados a 37°C por 12-18 horas com agitação.

Após o crescimento, foram semeados em placas de ágar McConkey e incubados a 37°C por 12-18 horas. Foi utilizada uma alça de platina esterilizada com calor para realização do teste. Os isolados foram considerados positivos para o string teste quando as colônias testadas formam um fio viscido com até 5mm de comprimento ou mais (Figura 10) (ARABAGHIAN et al., 2018).

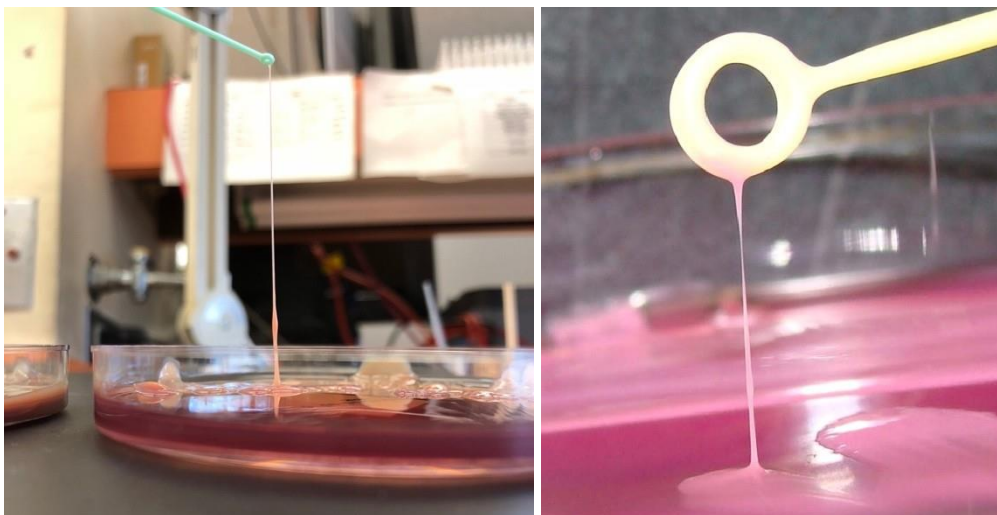


Figura 10 - String test positivo com visualização de fio mucóide maior que 5 mm.

Fonte: RIVEIRO et al, 2010

5.7 Gel de Eletroforese de Campo Pulsado

Para avaliarmos a similaridade genética dos isolados, foi adotada a técnica de gel de eletroforese de campo pulsado (PFGE), que consiste na utilização de uma enzima de restrição específica (XbaI Invitrogen™) que reconhece uma ou mais sequências alvo de DNA e o DNA nestas sequências. Esta técnica foi realizada de acordo com o padronizado pelo Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos (LGMM) da FIOCRUZ.

Os isolados foram cultivados em caldo nutritivo LB *overnight*. Uma alíquota deste (Low Melting Point) para formação de blocos que serão cortados e depositados em tubos contendo solução de lise (lisozima 2mg/ml; ThermoScientific) e incubados a 37°C por 15-18h. Na sequência, a solução de lise foi removida e acrescentada uma solução ESP (proteínase K 0,2mg/ml; Invitrogen) e incubada a 50°C por 18-24h. Passado o período de incubação a solução ESP foi removida e iniciou-se a lavagem dos blocos com solução TE de Tris-HCL 8.0M e EDTA 0.5M para a remoção de *debris* celulares no qual pode interferir na visualização das bandas forma das durante a corrida no gel de agarose.

Após as lavagens, a solução TE foi retirada e a enzima XbaI (10 U/μL) - Thermo Scientific™ foi acrescentada e incubada a 37°C *overnight*. Decorrido o tempo de incubação, a enzima foi retirada dos blocos. Os blocos foram derretidos a 80°C em banho-seco e 50μL de cada amostra é aplicado nos poços do gel de agarose (GEHealthagaroseNA) a 1,3% preparado com tampão TBE 0,3X. Assim que as amostras polimerizarem nos poços, o gel é colocado na cuba com o tampão de corrida TBE 0,3X refrigerado a 14°C, no sistema CHEFDR-II (BioRad, Califórnia, USA) com programação de Pulsos H inicial: 5", H final: 45", Ângulo: 120° e Voltagem: 6V por 18h. As bandas

foram visualizadas pela precipitação de brometo de étideo registrado em foto como equipamento Invitrogen™ iBright FL1000 Imager. O dendrograma foi obtido em software GelCompar II (Applied Maths), versão 6.5, utilizado o coeficiente de similaridade Dice, Análise de Cluster UPGMA, com o apoio do Dr. Maurício Oguskudo (INPA).

5.8 Teste de Adesão HeLa *invitro*

Este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar se os isolados de *Klebsiella* possuem fator de adesão em células tumoral HeLa. Primeiramente, as bactérias foram retiradas a partir do estoque em ágar nutriente, e inoculadas em 3 ml de Caldo Tripto Caseína de Soja e incubadas a 37° C por 16/18 horas. Após o crescimento, elas foram quantificadas e padronizadas na DO $1,5 \times 10^8$.

Na cultura, o meio de cultivo DF12 10% (v/v) foi retirado dos orifícios de cultura e os poços foram submetidos a três lavagens com solução tampão salina – fosfato de Dulbecco estéril - Vogt, pH 7.4 (PBS-D-V). Posteriormente, foram acrescentados: 0,96mL de novo meio DF12, contendo 10% de soro fetal bovino (DF12-SFB 10%), e 40µl de crescimento bacteriano padronizado na DO correta, e incubado por 3 horas em estufa a 37°C. Após incubação, o meio de cultivo foi removido e a monocamada celular foi lavada por cinco vezes com PBS 1X, a fim de se retirarem às bactérias que não se aderiram às células em cultivo. Em seguida, as células foram fixadas com uma solução de Bouin por 10min. Após esse período, as células foram lavadas por duas vezes e coradas com soluções do Kit de coloração Panótico Rápido (Laborclin, Paraná, Brasil) por um minuto. As amostras foram observadas ao microscópio óptico, com os aumentos de 40X e 100X. As amostras bacterianas que não apresentaram um padrão de adesão claramente definido após 3 horas de incubação foram submetidas a novo teste, estendendo-se o período de incubação para 6 horas. A adesão foi considerada positiva se o index de adesão (IA) (média do número de bactérias por célula) foi ≥ 1 . Se > 1 a 5 bactérias por célula, o isolado foi considerado com baixa adesão; Se > 5 e < 10 bactérias por célula, o isolado foi considerado com moderada adesão; Se > 10 bactérias por célula, o isolado foi considerado com alta adesão (LIVRELLI et al., 1996).

Neste estudo, foram utilizados um total de 198 isolados previamente caracterizados como *Klebsiella* sp. pelo Laboratório DCDIA. Devido ao tempo decorrido, a primeira etapa deste estudo consistiu na reativação dessas amostras em caldo

LB e crescimento em meio seletivo McConkey. As 100 amostras apresentaram características bioquímicas compatíveis com *Klebsiella*. Como o ensaio bioquímico presuntivo utilizando para a identificação das bactérias não foi suficiente para diferenciar as espécies, estas foram submetidas à amplificação e sequenciamento do gene SHV Kvar, presente em todas as espécies de *Klebsiella* e padrão de identificação em espécies (RAMOS, 2014).

Segundo Ramos et al. (2014) as β -lactamases são separadas por classes que vão de A-D. O gene putativo Kvar_2736 possui características de enzimas de classe A cromossômica. A plataforma de busca de base de dados mostrou que o gene Kvar de *K. variicola* contém 99% de sequências que correspondem ao gene blaLEN e 91% de identidade com sequências do gene blaSHV. No estudo realizado em 2014, foram encontradas nove isolados que continham o gene blaLEN que dividiam de 99 a 100% de similaridade com a β -lactamase de classe A encontrada no genoma de *K. variicola*. Realizou-se então uma análise *in silico* para verificar a distribuição do gene blaLEN onde observou-se que a *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. variicola* e *Klebsiella* sp. apresentaram equivalência com β -lactamases de classe A cromossômicas, incluindo os genes blaLEN, blaSHV e blaOXY. Por possuir alta taxa de identidade com o gene blaLEN que está contido espécies do gênero *Klebsiella*, o gene SHV-Kvar foi utilizado no estudo como marcador de identificação de espécies. Esta etapa foi realizada em colaboração com o Laboratório de Genética de Microbiologia Molecular (LGMM-FIOCRUZIOC) sob a coordenação da Dra. Ana Carolina Paulo Vicente, que recentemente realizou a padronização de um protocolo de PCR multiplex “One-Step” para identificação e diferenciação de espécies de *Klebsiella* na rotina clínica (FONSECA et al., 2017).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Identificação das amostras

O grupo de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia (DCDIA) - Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz/ AM, realizou nos anos de 2007 a 2012 um grande estudo epidemiológico abrangendo crianças de 0-10 anos atendidas com quadro de diarreia em hospitais públicos de Manaus (AM) e PortoVelho (RO). Com o objetivo de investigar os principais agentes causadores de diarreia, foram identificadas as *Escherichia coli* patogênicas (62,1%), seguido de Rotavírus (15,4%), *Salmonella* (14,3%), *Yersinia* (2,5%) e *Shigella* (2,5%) (CRUZ et al., 2014). Apesar de não pertencerem aos patógenos mais frequentes, um dado que chamou a atenção do grupo foi a presença da bactéria *Klebsiella* em crianças com diarreia, uma vez que esta bactéria é normalmente associada a infecções nosocomiais.

Como resultados, 23 amplificaram o gene SHV-KVar (Tabela 3) e foram sequenciadas em equipamento Illumina. Dentre as espécies identificadas, a espécie *K. quasipneumoniae* foi a mais frequente (11/23), seguida de *K. variicola* (5/23) e *K. pneumoniae* (2/23) e 5 foram identificadas apenas como pertencentes a espécie *Klebsiella* sp.

Tabela 3 - Amostras isoladas e identificadas neste estudo

Isolado	Identidade SHV-Kvar	Origem	ANO
10452	<i>K. variicola</i>	Porto Velho	2008
10800	<i>K. quasipneumoniae</i>	Porto Velho	2008
PV142	<i>K. quasipneumoniae</i>	Porto Velho	2008
PV146	<i>K. quasipneumoniae</i>	Porto Velho	2008
390-A	<i>K. quasipneumoniae</i>	Manaus	2008
138	<i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i>	Manaus	2008
629B	<i>K. quasipneumoniae</i>	Manaus	2008
629A	<i>Klebsiella</i> sp.	Manaus	2008
341	<i>k. quasipneumoniae</i>	Manaus	2007
590	<i>Klebsiella</i> sp.	Manaus	2007
40A	<i>Klebsiella</i> sp.	Manaus	2007
40B	<i>Klebsiella</i> sp.	Manaus	2007
125	<i>k. quasipneumoniae</i>	Manaus	2007
159A	<i>K. pneumoniae</i>	Manaus	2007
163A	<i>K. variicola</i>	Manaus	2007
211	<i>Klebsiella</i> sp.	Manaus	2007
163B	<i>K. variicola</i>	Manaus	2007
159B	<i>K. pneumoniae</i>	Manaus	2007
158A	<i>K. quasipneumoniae</i>	Manaus	2007
158B	<i>K. quasipneumoniae</i>	Manaus	2007
420	<i>K. quasipneumoniae</i>	Manaus	2012
770	<i>K. variicola</i>	Manaus	2012
100D	<i>K. variicola</i>	Manaus	2012

Segundo Briesse e colaboradores (2014) a *Klebsiella quasipneumoniae*, a *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* e a *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *Similipneumoniae* são consideradas espécies irmãs com 97,8% de similaridade.

Os métodos convencionais empregados para identificação das espécies apontam erroneamente a espécie *Klebsiella pneumoniae* como o agente causal de várias doenças. Long e colaboradores (2017) realizou um estudo que envolveu o sequenciamento completo de isolados de *Klebsiella pneumoniae* obtidos de amostras de infecções em humanos e revelou

que existem frequentes erros na identidade destes isolados com os métodos convencionais de identificação laboratoriais, que por vezes são confundidas com outras espécies do gênero. Metodologias como a bioquímica clássica (MARTINEZ- ROMERO et al., 2018), PCR multiplex (RODRIGUES et al., 2018), MALDI TOFF MS (LONG et al., 2017), dentre outras, tentaram sem sucesso fazer a separação destas espécies.

Contudo, até o presente momento, nenhuma delas consegue identificar 100% dos isolados testados, restando por vezes, somente a identificação do genoma completo como capaz de fazer esta distinção e encarecendo a rotina laboratorial. As 23 amostras estudadas foram agrupadas em uma árvore filogenética quanto a similaridade do gene SHV-Kvar (Figura 11). Como resultados, as amostras se agruparam em um único cluster. Apesar disso, as amostras de *K. variicola* PV10452, PV25, 163B e 100D se ramificam em um subcluster. A amostra *K. variicola* 770, no entanto, não se encaixou neste subcluster, agrupando-se com a *K. variicola* referência strain 345.

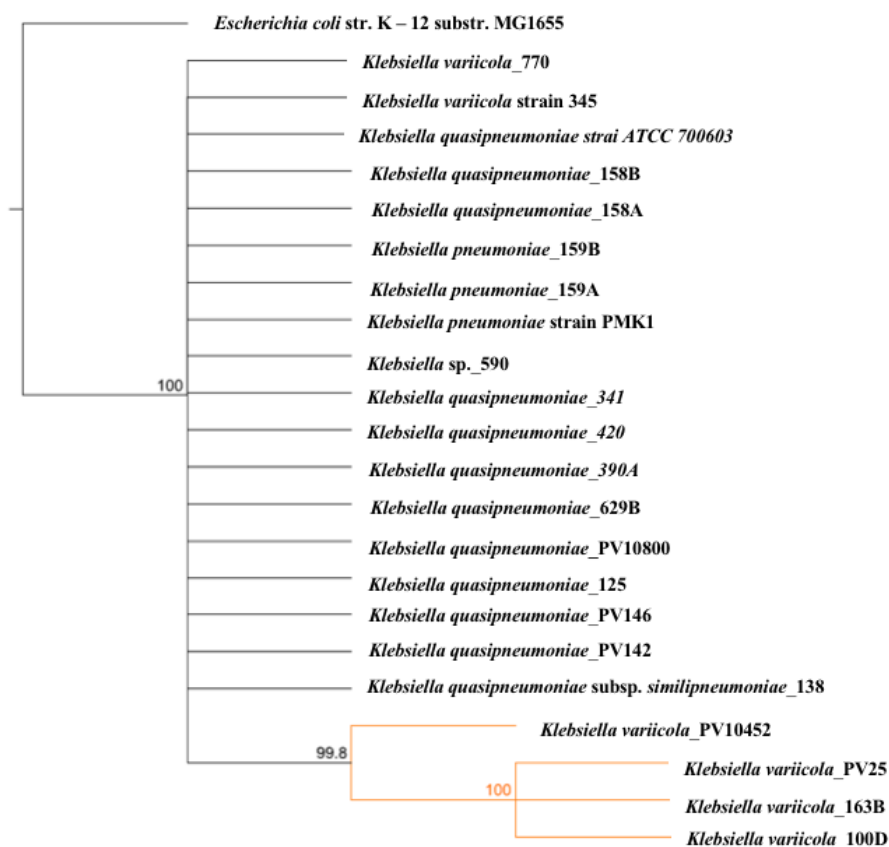


Figura 11- Árvore filogenética das amostras estudadas quanto a similaridade do gene SHV-Kvar.

6.8 Resistência a antimicrobianos

Com relação a suscetibilidade a antimicrobianos (Tabela 4), todas as amostras foram resistentes a ampicilina (23/23). Este resultado era esperado, uma vez que todas as espécies de *Klebsiella* possuem resistência natural intrínseca a este antibiótico (KIM et al., 2016). As maiores taxas de suscetibilidade ocorreram entre as fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e os inibidores da via dos folatos.

Um estudo em Mumbai, Índia, envolvendo uma avaliação da sensibilidade de isolados de *Klebsiella* em pacientes com queimaduras isolados por 21 anos entre 1994 até 2014, demonstrou mais de 50% de sensibilidade entre os isolados nos seguintes antibióticos: Tigerciclina (95.4%); Levofloxacino (90.8%); Cefepime + Tazobactam (84.4%); Gatifloxacino (80.3%); Cefoperazona + Sulbactam (78%); Piperacilina+Tazobactam (72.38%); Meropenem (70.8%); Imipenem (67.74%); Amicacina (64.3%); Azitromicina (52.2%) (SRINIVASAN et al., 2017). Da mesma forma, no estudo aqui realizado, encontramos sensibilidade em 86% das amostras para fluoroquinolonas e 91% para os aminoglicosídeos (Tabela 4).

Antibióticos da família das fluoroquinolonas como o ciprofloxacino ou norfloxacino ainda são recomendados para o tratamento de *Klebsiella* e outras bactérias Gram-negativas em geral. Apesar disso, já se observa um crescente aumento em isolados resistente a estes medicamentos (FUURSTED E SCHUMACHER, 2002). Para os isolados encontrados em Manaus (AM) e Porto Velho (RO), no entanto, estes medicamentos podem ser bons candidatos se necessária administração de antibióticoterapia. As amostras de *Klebsiella* sp. (211, 590, 40A, 40B) e as amostras de *K. pneumoniae* (159A e 159B) tiveram as maiores taxas de sensibilidade (Tabela 4). *K. pneumoniae* são descritas pela literatura como pertencentes a flora comensal do intestino de seres humanos (BAILEY et al., 2010). A ausência de resistência destas amostras sugere este aspecto comensal para estas amostras.

As amostras identificadas como *K. variicola* e *K. quasipseumoniae* apresentaram, de forma geral resistência a 3 ou mais antibióticos (Tabela 4). A *K. variicola* (163A e 163B) apresentaram resistência a 5 antibióticos (CAZ-CFL-MER-IPM-ATM e CTX- CAZ-CFL-IPM-ATM, respectivamente). A *K. variicola* foi inicialmente associada as plantas fixadoras de nitrogênio (ROSENBLUETHetal., 2004) e teve o primeiro genoma de uma amostra patogênica sequenciado, pelo grupo LGMM – FIOCRUZ IOC – de uma amostra de fezes proveniente do Rio de Janeiro (FONSECA et al., 2017). Assim como a *K. pneumoniae*, a *K. variicola* é frequentemente associada a infecções oportunistas. A alta taxa de resistência destas amostras pode sugerir um possível papel destas amostras no quadro diarreico destas crianças.

Em um estudo de caso envolvendo o *draft* do genoma da *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* strain KP_Z4175 resistente a β -lactamase por disco difusão, isolada de um paciente de 53 anos com linfoma cecal obstrutivo, identificou três genes de resistência à β -lactamase, três à aminoglicosídeos, dois à fluoquinolonas, dois à fenol, um à rifampicina, dois à sulfonamidas, um à tetraciclina e um à trimetropim (OZER et al., 2016).

Apesar da presença do gene não significar a expressão do fenótipo de resistência, sua presença indica o potencial de resistência a antibióticos desta amostra. A presença de isolados resistentes e multirresistentes de *K. quasipneumoniae* já é descrita em vários estudos (MATHERS et al., 2019; BRINKAC et al., 2019; OZER et al., 2016). No atual estudo, as amostras de *K. quasipneumoniae* 420, PV142 e PV146 apresentaram resistência a 4 ou mais antibióticos (CIP-CTX-CAZ-CFL, CTX-CAZ-CFL- MER-IPM-ATM, CTX-CAZ-MER-IPM-SUT).

Por se tratar de uma espécie recentemente classificada, não há estudos na região Norte envolvendo *K. quasipneumoniae*, e a presença de dois isolados do estado de Rondônia e um do Amazonas com resistências a múltiplos antibióticos é um indicativo do potencial de virulência destas amostras circulantes no Norte do país.

Tabela 4 - Tabela de suscetibilidade a antimicrobianos

ESPÉCIE	AMOSTRA	FLUOROQUINOLONAS			AMINOGLICOSÍDEOS		CEFALOSPORINA			CARBAPENÊMICOS		INIBIDORES DA VIA DO FOLATO	BETA-LACTÂMICOS	PENICILINA
		NOR	NAL	CIP	GEN	AMI	CTX	CAZ	CFL	MER	IPM	SUT	ATM	AMP
<i>k. quasipneumoniae</i>	125													
<i>K. quasipneumoniae subsp. similipneumoniae</i>	138													
<i>Klebsiella sp.</i>	211													
<i>k. quasipneumoniae</i>	341													
<i>K. quasipneumoniae</i>	420													
<i>Klebsiella sp.</i>	590													
<i>K. variicola</i>	770													
<i>K. variicola</i>	100D													
<i>K. quasipneumoniae</i>	158A													
<i>K. quasipneumoniae</i>	158B													
<i>K. pneumoniae</i>	159A													
<i>K. pneumoniae</i>	159B													
<i>K. variicola</i>	163A													
<i>K. variicola</i>	163B													
<i>K. quasipneumoniae</i>	390A													
<i>Klebsiella sp.</i>	40A													
<i>Klebsiella sp.</i>	40B													
<i>Klebsiella sp.</i>	629A													
<i>K. quasipneumoniae</i>	629B													
<i>K. variicola</i>	PV10452													
<i>K. quasipneumoniae</i>	PV10800													
<i>K. quasipneumoniae</i>	PV142													
<i>K. quasipneumoniae</i>	PV146													

Legenda: NOR: norfloxacina, NAL: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, AMI: amicacina, SUT: sulfametoxazol + trimetropim, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftadizima, CFL: cefalotina, MER: meropenem, IPM: imipinem, ATM: aztreonama, AMP: ampicilina. Amarelo: **Sensível**; Vermelho: **Resistente**.

Quando analisados por famílias, as maiores taxas de resistências ocorreram entre as famílias das cefalosporinas (CEFA) e os carbapenêmicos (CARBA) (Gráfico 1). Em 23 amostras 78,26% apresentam resistência a família CEFA, 69,57% a família CARBA. As menores taxas de resistência encontram-se entre os aminoglicosídeos.

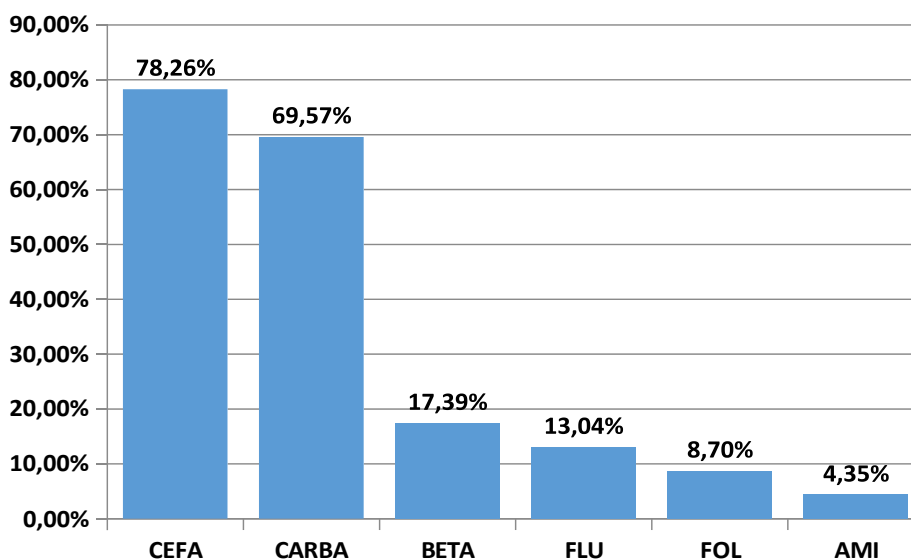


Figura 12 - Porcentagem de resistência por família.

Legenda: CEFA: Cefalosporina; CARBA: Carbapenêmicos; BETA: β -Lactâmicos; FLU: Fluruoquinolonas; FOL: Inibidores da via folato; AMI: Aminoglicosídeos

As altas prevalências de resistência entre *Klebsiella quasipneumoniae* e carbapenêmicos já foram descritas em vários estudos. Um estudo envolvendo 74 isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos de 12 hospitais em Sichuan, na China, revelou a presença dos genes *blaKPC-2* (n = 48), *blaNDM* (n = 22), e *blaIMP-4* (n = 4). Quando realizado o sequenciamento destes genes, estes isolados foram re-identificados como *K. pneumoniae* (n=67), *K. variicola* (n=5), e *K. quasipneumoniae* (n=2) (LIUetal., 2018). Em um estudo no hospital da Universidade da Virgínia (EUA), de amostras coletadas do ambiente hospitalar de 2007 a 2017, todas as amostras identificadas previamente como *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos com a presença do gene *blaKPC*, 32 foram re-identificadas como *K. quasipneumoniae* (MATHERS et al., 2019). Neste estudo atual, grande parte das amostras apresentou resistência a antibióticos da família dos carbapenêmicos, a cefalosporinas, ou a ambas as famílias (Figura 13). Tanto a resistência as carbapenemases quanto as cefalosporinas em *Klebsiella* são um problema de emergência mundial.

Quanto a cefalosporinas, um estudo sobre o isolado hipervirulento de *K. pneumoniae* (RJA166) resistente a terceira geração de cefalosporinas revelou a presença de um gene de resistência *blaDHA* carreado por um plasmídeo natural, podendo este contribuir para distribuição rápida desta resistência entre as espécies de *Klebsiella* e outras bactérias (XIE et al., 2018).

Desta forma, do total de 23 isolados, foi possível separar a resistência a antimicrobianos pelas famílias a qual eles pertencem (Figura 13). Quanto a resistência conjunta a pelo menos duas famílias, 26,1% foram para cefalosporinas e carbapenêmicos (CEFA_CARBA), e 4,3% para carbapenêmicos e fluorquinolonas (FLU_CARBA) e cefalosporina e fluorquinolonas (FLU_CEFA). Quando analisado a resistência a três famílias, 17,4% apresentaram resistência as famílias cefalosporinas, carbapenêmicos e β -lactâmicos (CEFA_CARBA_BETA), e 8,7% para cefalosporinas, carbapenêmicos e inibidores da via do folato (CEFA_CARBA_FOL). Para 4 famílias, apenas 4,3% para cefalosporina, carbapenêmicos, aminoglicosídeos e fluorquinolonas (FLU_AMI_CEFA_CARBA).

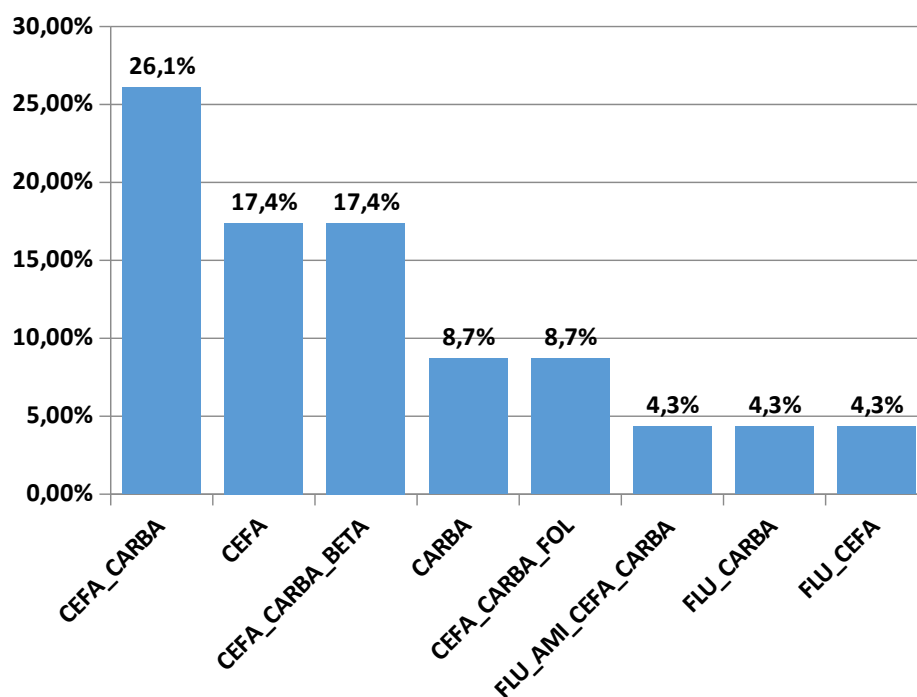


Figura 13 - Porcentagem de amostras multirresistentes (MDR).

Legenda: CEFA: Cefalosporina; CARBA: Carbapenêmicos; BETA: β -Lactâmicos; FLU: Fluroquinolonas; FOL: Inibidores da via folato; AMI: Aminoglicosídeos

A determinação da resistência possibilita classificação dos isolados como não multirresistentes (n-MDR), multirresistente (MDR) ou pan-resistente (PDR). São considerados isolados MDR, aqueles que são resistentes a pelo menos um fármaco de três famílias diferentes. São PDR àqueles que são resistentes a pelo menos um antibiótico de todas as famílias disponíveis para tratamento (DINI, 2016). Uma outra classificação, não muito reportada, são as cepas XDR (do inglês, extremely drug resistant) que referere-se à extrema resistência aos fármacos (MAGIORAKOS et al., 2012).

Por este conceito, neste estudo não há ocorrência de amostras classificadas como pan-resistentes (PDR). Quanto a multirresistentes (MDR), os isolados de *K. quasipneumoniae* 420, 125, PV146 e PV142, de *K. variicola* 163A e 163B, e de *Klebsiella* sp. 211 e 629A são positivas para este fenótipo, sendo a última o único isolado resistente a 4 famílias de antibióticos (629A). Segundo Pitout e colaboradores (2015) uma das chaves para a dominância de espécie de *K. pneumoniae* em infecções nosocomiais é a resistência a carbapenemases. Nos anos 80, cefalosporinas, fluoquinolonas e trimetropim + sulametoxazol era comumente usado para *K. pneumoniae*. Nos anos 2000, de 20 a 80% dos isolados do mundo já eram resistentes a esta primeira linha de antibióticos.

6.3. Biofilme

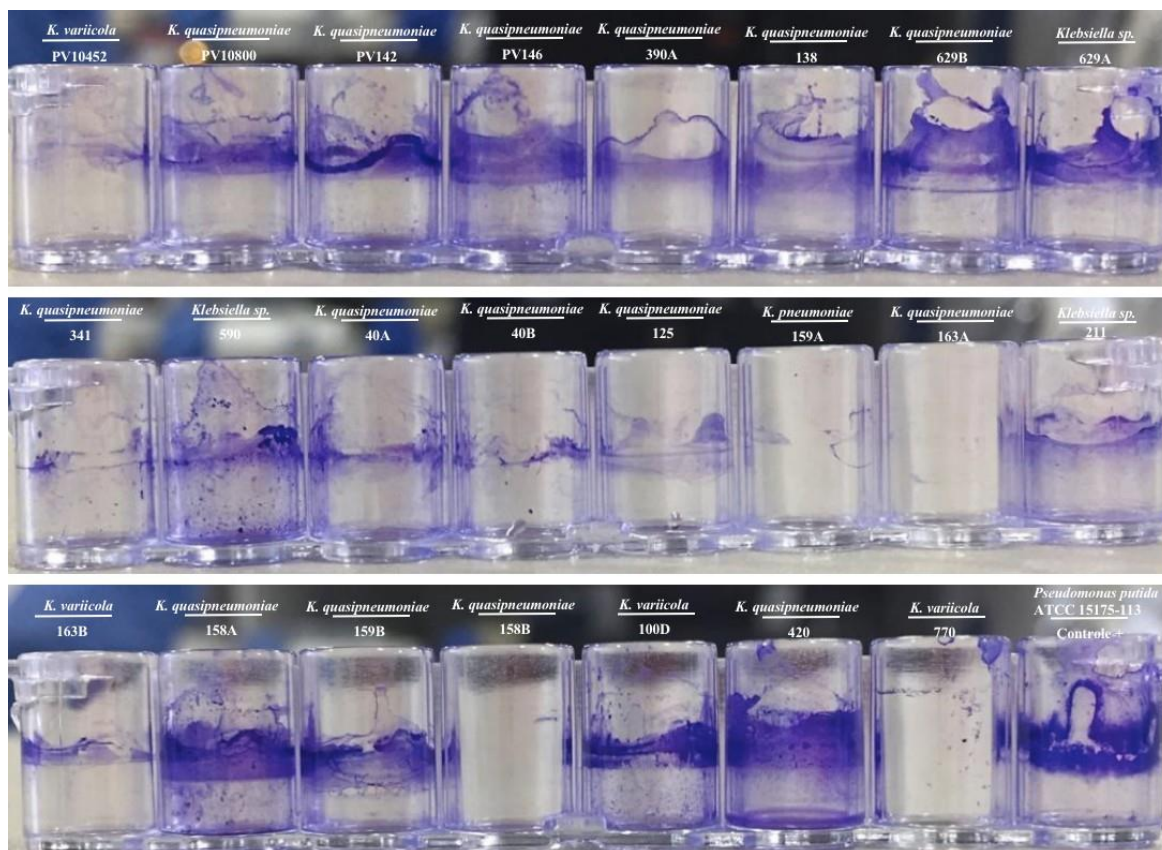


Figura 14 - Teste de formação de biofilme em placa de poliestireno (96 poços).

As amostras foram alinhadas de acordo com sua capacidade de formar biofilme pela medição da DO (Figura 13). Como controle positivo, foi utilizada uma *Pseudomonas putida*, uma bactéria conhecidamente formadora de biofilme. Os isolados 163A, 159A, 158B e PV10452 foram considerados negativos para o teste de formação do biofilme por apresentarem DO abaixo do valor do cutoff. Os demais isolados foram classificados como fracos a moderados quando abaixo da linha média de DO de 1,26 e fortes quando acima da média. No estudo de Singh e colaboradores (2019) foi observado que a concentração de alguns compostos químicos influenciam na densidade e viscosidade do biofilme.

O teste de formação de biofilme *in vitro* é utilizado para verificar a capacidade da *Klebsiella* em formar o biofilme, de forma estática, em placa de poliestireno *in vitro* (96 poços) (Figura 12). Os isolados de *K. quasipneumoniae* 158A, 420, 159B, PV142 e PV146 obtiveram forte produção de biofilme acima da média geral do grupo (DO 1,26) (Figura 13). Realizando a verificação da formação de biofilme desta bactéria medindo a DO, podemos inferir que alguns isolados são mais virulentos influenciando na sua patogênese, porque utilizam este mecanismo como resistência a antibióticos prejudicando a terapia e como forma de escape do sistema imune permanecendo no hospedeiro causando graves infecções.

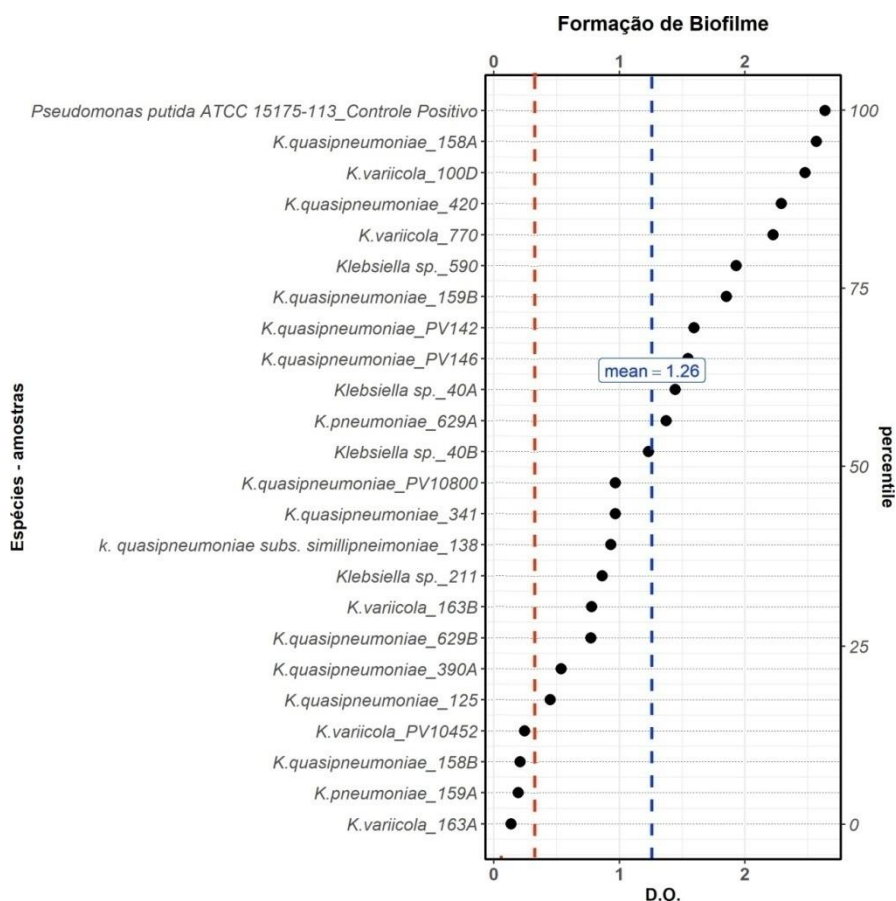


Figura 15 - Teste de formação de biofilme *in vitro*. Realizado em placa de poliestireno de 96 poços. Linha vermelha: DO controle negativo, linha *cutoff*; Linha azul: valor médio de DO.

6.4 Stringtest

Os isolados foram avaliados quanto a sua capacidade de hiperprodução de muco. Do total de isolados estudados (n=23), apenas as *K. quasipneumoniae* PV142, 390A, 341, 158A, 420, a *K. pneumoniae* 629A e *K. variicola* 100D foram positivas para o fenótipo de hiper mucoviscosidade (Tabela 4).

Isolados com o fenótipo de hiper mucoviscosidade já foram descritos como associados a casos de bacteremia, sepse em sítios anatômicos como fígado, sistema nervoso central e músculos (FAUVET et al., 2019).

Tabela 5 - Resultado do String test das amostras.

Nº da amostra	Espécie	String Test
PV 10452	<i>K. variicola</i>	-
PV 10800	<i>K. quasipneumoniae</i>	-
PV 142	<i>K. quasipneumoniae</i>	Positivo
PV146	<i>K. quasipneumoniae</i>	-
390A	<i>K. quasipneumoniae</i>	Positivo
138	<i>k. quasipneumoniae subs. simillipneumoniae</i>	-
629B	<i>K. quasipneumoniae</i>	-
629A	<i>K. pneumoniae</i>	Positivo
341	<i>K. quasipneumoniae</i>	Positivo
590	<i>Klebsiella sp.</i>	-
40A	<i>Klebsiella sp.</i>	-
40B	<i>Klebsiella sp.</i>	-
125	<i>K. quasipneumoniae</i>	-
159A	<i>K. pneumoniae</i>	-
163A	<i>K. variicola</i>	-
211	<i>Klebsiella sp.</i>	-
163B	<i>K. variicola</i>	-
158A	<i>K. quasipneumoniae</i>	Positivo
159B	<i>K. quasipneumoniae</i>	-
158B	<i>k. quasipneumoniae</i>	-
100D	<i>K. variicola</i>	Positivo
420	<i>K. quasipneumoniae</i>	Positivo
770	<i>K. variicola</i>	-

6.5 Cultura em células HeLa

Os isolados foram submetidos a teste de adesão em célula HeLa. A adesão é um dos primeiros passos para a formação de biofilme em *Klebsiella* (ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2018). As amostras de *K. quasipneumoniae* 159B e 158B, de *K. variicola* 770, de *K. pneumoniae* 629A e de *Klebsiella* sp. 420 foram negativas para o fenótipo de adesão. As amostras *K. quasipneumoniae* com Índice de adesão acima de 10 foram consideradas com alto índice de adesão, estas amostras foram 158A, 125, 138, 629B, 390A (Manaus), PV10800, PV142, PV146 (Porto Velho) (Tabela 6) (Figura 14).

Estudos mostraram que a aderência de *Klebsiella pneumoniae* em células HeLa é dependente de múltiplos tipos de fimbrias, dentre eles destacam-se os pilis tipo 1, tipo 3 e *E. coli* common pilus (ECP), sendo o pili tipo 3 presente em 78% das amostras de *K. pneumoniae* aderentes, independente do nível de aderência, e o ECP presente em 91% e 80% dos isolados com aderência moderada e forte, respectivamente. Demonstrando a relação próxima entre a aderência em células HeLa e estas fimbrias (ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2018).

As taxas de adesão de uma *Klebsiella* encapsulada são significativamente menores que com sua variante não encapsulada (SAHLY et al., 2000). Apesar disso, tanto as cápsulas lipolissacarídeas, quanto as fimbrias responsáveis pela adesão celular são considerados fatores de virulência chave para a *K. pneumoniae* e possuem um grande papel nos estágios iniciais da infecção (HUYNH et al., 2017).

Apesar de detectadas altas taxas de invasão neste estudo, quais fimbrias estão presentes neste processo para *Klebsiella quasipneumoniae* ainda não estão elucidados. Em um estudo do genoma de isolados de *K. quasipneumoniae*, 37,5% (n=8) possuíam a presença da fimbria FimV (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 2018), ausentes em *K. pneumoniae*. Estudos futuros com as amostras de *K. quasipneumoniae* com altas taxas de aderência deste atual projeto, envolvendo a pesquisa molecular de pili e fimbrias, são necessários para definir seu envolvimento neste fenótipo.

Tabela 6 - Padrão de adesão dos isolados de *Klebsiella* in vitro em célula HeLa.

ESPÉCIE	Index de Adesão
<i>K. quasipneumoniae</i> _158A	24,25
<i>K. quasipneumoniae</i> _PV10800	23,2
<i>K. quasipneumoniae</i> _125	15
<i>K. variicola</i> _PV10452	18,8
<i>K. quasipneumoniae</i> _PV142	42
<i>K. quasipneumoniae</i> _341	7
<i>K. variicola</i> _100D	21,5
<i>K. quasipneumoniae</i> _420	-
<i>K. pneumoniae</i> _159A	16
<i>Klebsiella</i> sp._590	8,2
<i>K. variicola</i> _770	-
<i>K. quasipneumoniae</i> _159B	-
<i>K. quasipneumoniae</i> _PV146	15,75
<i>Klebsiella</i> sp._40A	-
<i>K. pneumoniae</i> _629A	-
<i>K. quasipneumoniae</i> subs. <i>similipneumoniae</i> _138	32,5
<i>Klebsiella</i> sp._211	40
<i>K. variicola</i> _163B	18,8
<i>K. quasipneumoniae</i> _629B	19,4
<i>K. quasipneumoniae</i> _390A	11
<i>K. quasipneumoniae</i> _158B	-
<i>K. variicola</i> _163A	14
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 15175-113 (Controle +)	20,8

* Média do número de bactérias por célula (LIVRELII, et al., 1996)

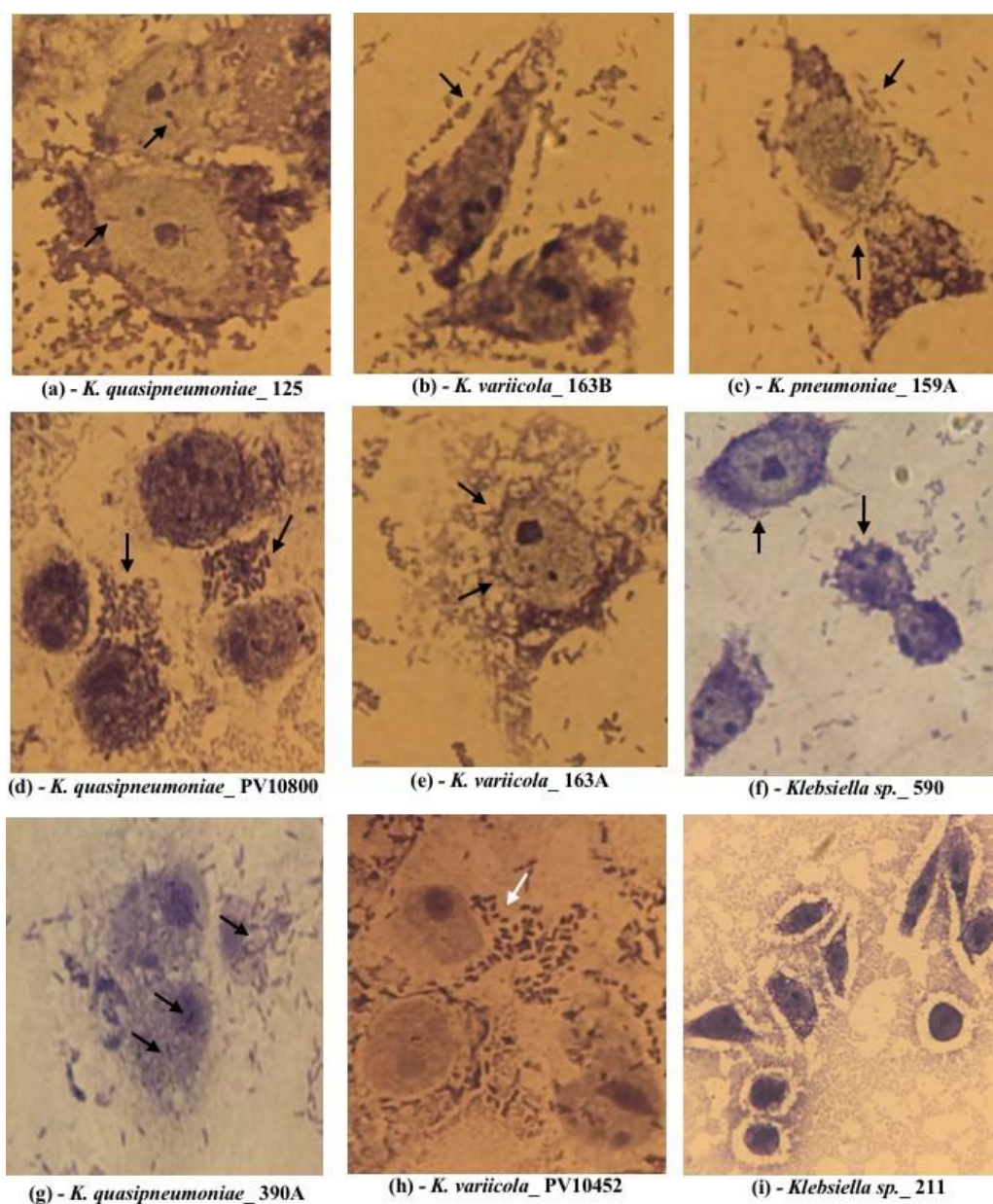


Figura 16 - Teste de adesão em célula HeLa. Setas indicam adesão dos isolados de *Klebsiella*.

6.6 Gel de eletroforese de campo pulsado (PFGE)

Os resultados foram analisados de acordo com as recomendações previamente descritas por Tenover (1995), onde isolados foram considerados **indistinguíveis ou idênticos** quando seus perfis de restrição tiveram os mesmos números de bandas e as bandas correspondentes possuíram aparentemente os mesmos tamanhos, isto é, apresentaram 100% de similaridade; foram considerados isolados **fortemente relacionados** aqueles em houve duas ou 3 bandas diferentes, isto é, valores entre 70 a 90% de similaridade genética; considerados **possivelmente relacionados** aqueles os quais diferiram um dos outros por apresentarem de 4 a 6 bandas diferentes, isto é, similaridade genética entre 50 a 69%; e considerados **isolados independentes ou únicos** àqueles que apresentaram similaridade genética menor que 50%.

Como resultados, nenhuma amostra apresentou perfil clonal indistinguível ou idêntico. Porém, os isolados *Klebsiella* sp. 211 e *K. quasipneumoniae* 158B (86%) (A); *K. variicola* 100D e *Klebsiella* sp. 629A(74%) (B); *K. variicola* 163B e *K. variicola* PV10452 (72%) (C); *K. quasipneumoniae* PV10800 e *K. quasipneumoniae* 138 (70%) (D) foram consideradas fortemente relacionadas (Figura 15). Os isolados 163B / PV10452 e PV126 / 138 compartilham uma forte relação clonal é um dado interessante pois estas amostras são de estados diferentes e coletadas em períodos distintos. O que nos leva a crer uma circulação destes isolados por ambos os estados, o que é possível, devido a distância de Manaus e Porto Velho e acesso tanto via aérea (761Km - 1h aproximadamente), quanto via terrestre (888Km viaBR-319).

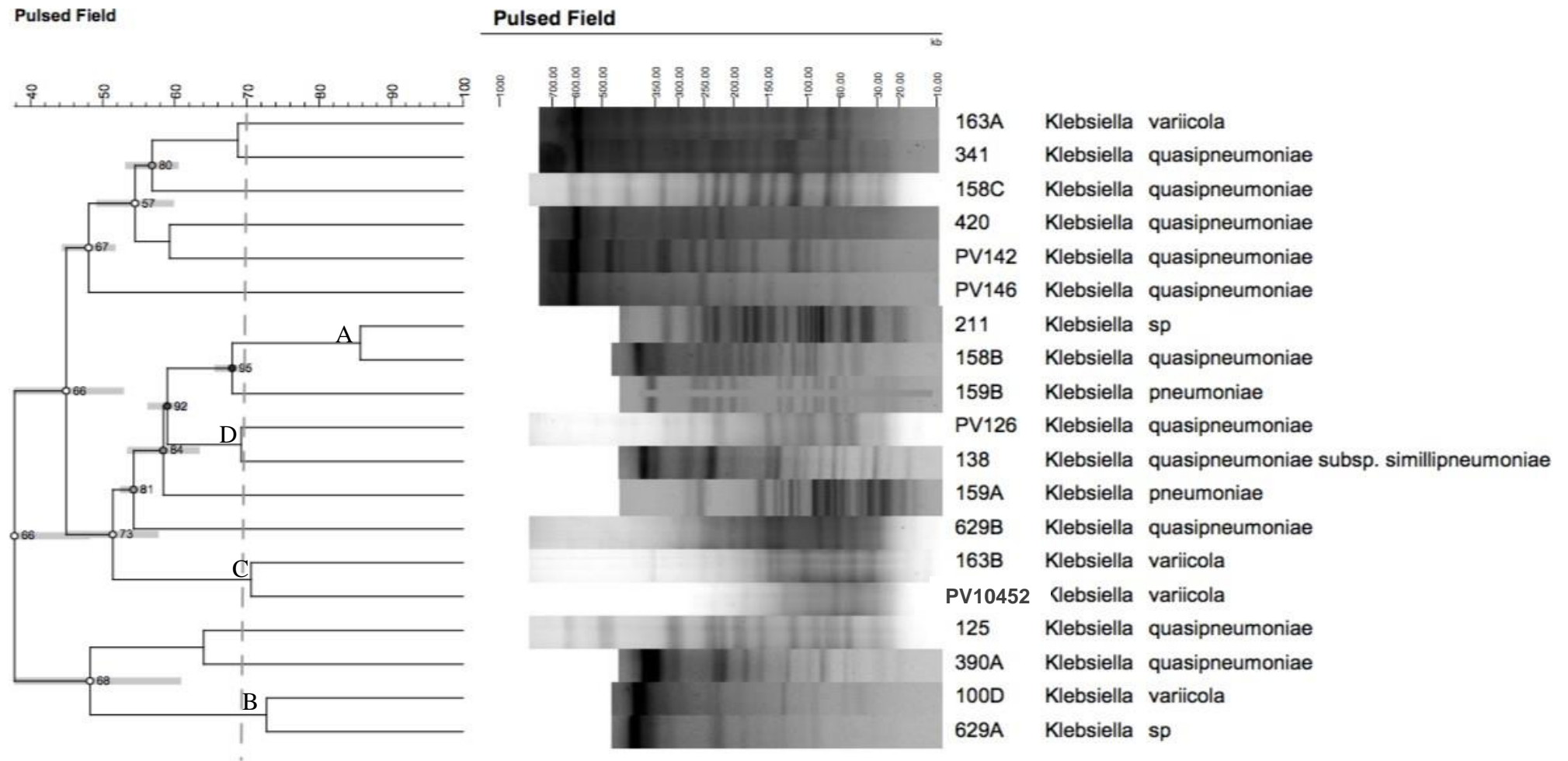


Figura 17: Similaridade genética por PFGE dos isolados do estudo. Amostras cortadas com enzima de restrição XbaI.

6.7 Epidemiologia dos isolados

Durante a coleta (2007-2012) foi realizado um questionário epidemiológico a cerca de informações pertinentes a frequência de episódios diarreicos, antibacterioterapia, idade, entre outros. Para fins de comparação, os dados referentes as crianças nas quais foram isolados as *Klebsiella quasipneumoniae* foram comparados aos de crianças cujo patógeno bacteriano causador da doença diarreica estava claro, a bactéria *Shigella*. A *Shigella* é um enteropatógeno, Gram-negativo, assim como a *Klebsiella*. Foram excluídos destes grupos associações entre *Shigella* e Rotavírus. A tabela 7 resume os dados epidemiológicos encontrados neste estudo.

Tabela 7 – Dados epidemiológicos das amostras estudadas.

Variáveis	<i>K.quasipneumoniae</i>	<i>Shigella</i>	P-valor	
	n = 11	n = 21		
Hospital			0.357	a
Fiooeste _ HC Zona Oeste	1 (11.1)	6 (28.6)		
Fioleste HC Zona Leste	3 (33.3)	9 (42.9)		
Fiosul HC Zona Sul	5 (55.6)	6 (28.6)		
Idade			0.428	b
Média (IQR)	1 (0,8,2)	1.3 (0,4,1,9)		
Sexo			0.704	a
F	3 (33.3)	9 (42.9)		
M	6 (66.7)	12 (57.1)		
Duração em dias			0.471	b
Média (IQR)	2 (1,3)	3 (1,3)		
Quantidade de episódios por ano			0.79	b
Média (IQR)	0 (0,2)	1 (0,2)		
Internação anterior			1	a
Negativo	7 (77.8)	16 (76.2)		
Positivo	2 (22.2)	5 (23.8)		
Contaminação parental			0.563	a
Negativo	7 (77.8)	19 (90.5)		
Positivo	2 (22.2)	2 (9.5)		
Tempo de amamentação			0.699	b
Média (IQR)	7 (3,10)	6 (3,10)		
Número de indivíduos na casa			0.211	c
Média (IQR)	4.4 (1,3)	5 (1,1)		
Número de Cômodos			0.055	c
Média (IQR)	2.9 (1,8)	4.1 (1,5)		
Tipo de abastecimento			0.491	a
Encanada	4 (44.4)	12 (57.1)		
Fervida	0 (0)	1 (4.8)		
Poço	4 (44.4)	8 (38.1)		
Torneira	1 (11.1)	0 (0)		
Água para consumo			0.545	a
Com hipoclorito	0 (0)	1 (4.8)		
Encanada	1 (11.1)	2 (9.5)		

Fervida	0 (0)	2 (9.5)		
Filtrada	1 (11.1)	6 (28.6)		
Mineral	4 (44.4)	3 (14.3)		
Poço	3 (33.3)	7 (33.3)		
Higiene com a criança			1	a
As vezes	2 (22.2)	5 (23.8)		
Habitualmente	2 (22.2)	6 (28.6)		
Sempre	5 (55.6)	10 (47.6)		
Higiene com alimentos			1	a
As vezes	2 (22.2)	5 (23.8)		
Habitualmente	2 (22.2)	6 (28.6)		
Sempre	5 (55.6)	10 (47.6)		
Higiene pessoal			0.678	a
As vezes	2 (22.2)	5 (23.8)		
Habitualmente	1 (11.1)	6 (28.6)		
Sempre	6 (66.7)	10 (47.6)		
Antibioticoterapia atual			1	a
Negativo	8 (100)	16 (88.9)		
Positivo	0 (0)	2 (11.1)		
Febre			0.666	a
Não	3 (33.3)	5 (23.8)		
Sim	6 (66.7)	16 (76.2)		
Vômito			1	a
Não	2 (22.2)	6 (28.6)		
Sim	7 (77.8)	15 (71.4)		
Desidratação			0.651	a
Não	3 (37.5)	5 (25)		
Sim	5 (62.5)	15 (75)		
Sangue visível			0.633	a
Não	8 (88.9)	15 (75)		
Sim	1 (11.1)	5 (25)		
Cor das Fezes			0.336	a
Amarelo	3 (33.3)	8 (38.1)		
Incolor	0 (0)	1 (4.8)		
Marrom	4 (44.4)	3 (14.3)		
Verde	2 (22.2)	9 (42.9)		
Consistência			0.001	a
Líquida	6 (66.7)	18 (85.7)		
Pastosa	3 (33.3)	3 (14.3)		
Muco			0.622	a
Não	2 (22.2)	3 (14.3)		
Sim	7 (77.8)	18 (85.7)		
Presença de alimento			0.207	a
Não	7 (77.8)	20 (95.2)		
Sim	2 (22.2)	1 (4.8)		
PSO (Sangue oculto)			0.049	a
Negativo	8 (88.9)	10 (47.6)		
Positivo	1 (11.1)	11 (52.4)		
Fungo			1	a
Negativo	6 (85.7)	5 (100)		
Positivo	1 (14.3)	0 (0)		
Rotavirus			0.083	a
Negativo	7 (77.8)	21 (100)		
Positivo	2 (22.2)	0 (0)		

a Fisher's exact test; b Ranksum test; c t-test

Quanto a zona da cidade, grande parte dos isolados de *K. quasipneumoniae* foram de crianças atendidas no Hospital da Criança da Zona Sul, com a faixa etária média de 1 ano e duração média do quadro diarreico foi de 2 dias. Segundo a OMS, as doenças diarreicas atingem principalmente crianças até 5 anos com duração de até 3 dias.

Quanto aos sintomas, foi relatado febre, vômito e desidratação nas crianças com isolados de *K. quasipneumoniae*, porém, o mesmo quadro também foi encontrado em crianças com *Shigella*. Somente o sangue oculto nas fezes (PSO) teve diferença significativa ($P < 0.05$), o que é esperado, pois a *Shigella* é caracterizada por causar uma disenteria muco-sanguinolenta. Quanto a co-reconsistência das fezes, a *K. quasipneumoniae* não apresentou um padrão decoloração definido, porém a consistência teve diferença significativa quando comparada com a diarreia causada por *Shigella* ($P < 0.01$), uma vez que para *K. quasipneumoniae* um terço das crianças com diarreias tiveram fezes de consistência pastosa. Para comorbidades, apenas duas amostras de *K. quasipneumoniae* apresentou associação com rotavírus, sendo nestas amostras este vírus entérico o possível agente causal do episódio diarreico.

6.8 Potencial patogênico dos isolados estudados

Este estudo almejou a caracterização genotípica e fenotípica de isolados de *Klebsiella* provenientes de crianças atendidas com casos diarreicos na região Norte (Manaus e Porto Velho). Aqui descrevemos pela primeira vez na região norte a identificação de espécies de *Klebsiella quasipneumoniae* (Tabela 8). Foram identificadas ao total 11 isolados de *K. quasipneumoniae*, perfazendo quase 50% dos isolados estudados ($n=23$). Este alto número de isolados demonstra como o advento das ferramentas moleculares mudou a maneira de identificação bacteriana no mundo. Estes isolados, indistinguíveis por metodologia clássica bioquímica, mais de 10 anos após seu isolamento, foram reclassificadas, demonstrando o potencial ainda a ser descoberto na bacterioteca do grupo Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia (DCDIA). A exceção do isolado 158B, todos os isolados de *K. quasipneumoniae* apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico testado e os isolados 125 de Manaus e PV142 e PV146 de Porto Velho apresentaram fenótipo de multirresistência MDR e altas taxas de aderência em célula HeLa (Tabela 8). O isolado *K. quasipneumoniae* PV142 destaca-se por possuir entre os fenótipos de virulência multirresistência (MDR), alta formação de biofilme, hipermucoviscosidade, e altas taxas de adesão. Estes fatores demonstram o potencial patogênico destas amostras. Vários estudos tem descrito isolados antes conhecidos como comensais, causando graves infecções pela presença de multirresistência e outros fenótipos de virulência (PITOUT et al., 2015).

Da mesma forma, neste estudo, foram identificados isolados de *K. quasipneumoniae* acompanhando esta tendência. Se a resistência a carbapenemases é a chave para a dominância de espécie de *K. pneumoniae* em infecções nosocomiais (PITOUTetal.,2015), neste estudo, grande parte dos isolados de *K. quasipneumoniae* de fezes diarreicas de crianças já apresentava este fenótipo de resistência. Apesar da presença de fatores de virulência que auxiliam em processos como evasão do sistema imune (FAUVET et al., 2019) como altas taxas de formação de biofilme e hipermucoviscosidade, estudos adicionais *in vivo* ainda são necessários para definir se estes isolados foram a causa da doença diarreica.

Apesar disso, a presença de isolados com forte similaridade clonal entre Porto Velho e Manaus sugere uma circulação destes isolados na região Norte, e com a facilidade que a bactéria *Klebsiella* possui em transferir plasmídeos de resistência (XIE et al., 2018) este dado é alarmante, e ressalta a necessidade uma vigilância epidemiológica ativa e eficaz, com a capacidade de identificação correta de enteropatógenos de maneira clássica e, principalmente, molecular, antes de administração de antibioticoterapia.

Tabela 8 – Resultados fenotípicos e genotípicos dos isolados estudados

ESPÉCIE	MDR	Resistência	Biofilme	Hipermucoviscodade	Index de Adesão	PFGE*
<i>K. quasipneumoniae</i> _158A		CTX-IPM	Alta	Positivo	Alta	
<i>K. quasipneumoniae</i> _PV10800		CTX-ATM	Fraca/Moderada	-	Alta	D
<i>K. quasipneumoniae</i> _125	MDR	CAZ-IPM-SUT	Fraca/Moderada	-	Alta	
<i>K. variicola</i> _PV10452		CAZ-MER	-	-	Alta	C
<i>K. quasipneumoniae</i> _PV142	MDR	CTX-CAZ-CFL-MER-IPM-ATM	Alta	Positivo	Alta	
<i>K. quasipneumoniae</i> _341		CAZ	Fraca/Moderada	Positivo	Moderada	
<i>K. variicola</i> _100D		-	Alta	Positivo	Alta	B
<i>K. quasipneumoniae</i> _420		CIP-CTX-CAZ-CFL	Alta	Positivo	-	
<i>K. pneumoniae</i> _159A		CIP-IPM	-	-	Alta	
<i>Klebsiella</i> sp._590		CTX-CAZ-MER	Alta	-	Moderada	
<i>K. variicola</i> _770		CTX	Alta	-	-	
<i>K. quasipneumoniae</i> _159B		CTX	Alta	-	-	A
<i>K. quasipneumoniae</i> _PV146	MDR	CTX-CAZ-MER-IPM-SUT	Alta	-	Alta	
<i>Klebsiella</i> sp._40A		IPM	Alta	-	-	
<i>K. pneumoniae</i> _629A	MDR	NOR-CIP-GEN-AMI-CTX-CAZ-MER	Alta	Positivo	-	B
<i>K. quasipneumoniae</i> subs. <i>similipneumoniae</i> _138		CTX-CAZ-MER	Fraca/Moderada	-	Moderada	D
<i>Klebsiella</i> sp._211	MDR	CTX-CAZ-CFL-IPM-ATM	Fraca/Moderada	-	Alta	A
<i>K. variicola</i> _163B	MDR	CTX-CAZ-CFL-IPM-ATM	Fraca/Moderada	-	Alta	
<i>K. quasipneumoniae</i> _629B		CTX-CAZ-MER	Alta	-	Alta	C
<i>K. quasipneumoniae</i> _390A		CAZ	Fraca/Moderada	Positivo	Alta	
<i>K. quasipneumoniae</i> _158B		-	-	-	-	
<i>K. variicola</i> _163A	MDR	CAZ-CFL-MER-IPM-ATM	-	-	Alta	
<i>Klebsiella</i> sp._40B		IPM	Fraca/Moderada	-	-	
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 15175-113 (Controle +)			Alta		Alta	

* Somente amostras fortemente relacionadas

7. CONCLUSÕES

- Dos 100 isolados de Manaus e PortoVelho, caracterizado como *Klebsiella* por metodologia bioquímica entre 2007 a 2012, apenas 23 foram identificados pelo sequenciamento do gene SHV Kvar como *Klebsiella*;
- Dentre as espécies, a *K. quasipneumoniae* foi a mais identificada (n=11), seguida de *K. variicola* (n=5), *K. pneumoniae* (n=2), e *Klebsiella* sp.(n=5);
- O resultado da árvore filogenética mostrou que a *Klebsiella quasipneumoniae* ficou num cluster único, revelando baixa variedade genética entre os isolados;
- Estudos futuros são necessários para avaliar se as 77 amostras negativas para SHV Kvar são, de fato, negativas para *Klebsiella*. Ensaio como o MLST utilizando sete genes *house-keeping* podem ser aplicados em testes futuros para observarmos uma maior diversidade genética entre os isolados;
- A exceção do isolado 158B, todos os isolados de *K. quasipneumoniae* apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico testado e os isolados 125 de Manaus e PV142 e PV146 de Porto Velho apresentaram fenótipo de multirresistência MDR;
- Nem todas as espécies de *Klebsiella* possuem a habilidade de produzir biofilme, apesar disso, em nosso estudo, apenas 4 isolados não apresentaram este fenótipo. Quanto a aderência em células HeLa, 14 apresentaram forte índice de adesão, sendo destas, 7 *K. quasipneumoniae*. A hiper mucoviscosidade foi positiva para 5 isolados de *K. quasipneumoniae*. Todos estes fenótipos de virulência que estão aliados aos mecanismos de escape do sistema imune do hospedeiro, assim como na capacidade de interferir no tratamento com antibioticoterapia pelos pacientes. Isto demonstra o potencial patogênico destes isolados;
- O isolado *K. quasipneumoniae* PV142 destaca-se por possuir entre os fenótipos de virulência: multirresistência (MDR), alta formação de biofilme, hiper mucoviscosidade, e altas taxas de adesão;
- A presença de dois isolados, um do estado de Rondônia e um do Amazonas, com forte similaridade genética encontrada, evidencia a presença de *K. quasipneumoniae* circulantes na região Norte;
- Por se tratar de uma espécie recentemente classificada, não há estudos na região Norte envolvendo *K. quasipneumoniae*, sendo este o primeiro estudo a

descrever esta espécie no Norte. Ressaltamos a necessidade uma vigilância epidemiológica ativa e eficaz, com a capacidade de identificação correta de enteropatógenos de maneira clássica e, principalmente, molecular, antes de administração de antibioticoterapia;

- Se a resistência a carbapenemases é a chave para a dominância de *K. pneumoniae* no mundo, neste estudo, grande parte dos isolados de *K. quasipneumoniae* já apresentam este fenótipo de resistência. Apesar da presença de fatores de virulência que auxiliam em processos patogênicos, como a evasão do sistema imune, estudos adicionais ainda são necessários para definir se estes isolados foram a causa da doença diarreica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÁNTAR-CURIEL, M. D.; LEDEZMA-ESCALANTE, C. A.; JARILLO-QUIJADA, M. D.; GAYOSSO-VÁZQUEZ, C.; MORFÍN-OTERO, R.; RODRÍGUEZ-NORIEGA, E.; CEDILLO-RAMÍREZ, M. L.; SANTOS-PRECIADO, J. I.; GIRÓN, J. A. Association of Antibiotic Resistance, Cell Adherence, and Biofilm Production with the Endemicity of Nosocomial *Klebsiella pneumoniae*. **Biomed Res Int**, p. 9, 2018.
- ARABAGHIAN, H., SALLOUM, T., ALOUSI, S., PANOSSIAN, B., ARAJ, G. F., TOKAJIAN, S. **Molecular Characterization of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella quasipneumoniae* Isolated from Lebanon**. **Scientific Reports**, v. 9, 531, 2019.
- ARENA, F. et al. Draft Genome Sequence of the First Hypermucoviscous *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* Isolate from a Bloodstream Infection. **Genome Announcements**, v. 3, n. 5, p. e00952-15, 2015.
- ASLAM, F.; YASMIN, A.; THOMAS, T. Genome Sequence of *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* MB373, an Effective Bioremediator. **Genome announcements**, v. 4, n. 5, 2016.
- BAILEY, J. K.; PINYON, J. L.; ANANTHAM, S.; HALL, R.M. Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: are reservoir for antibiotic-resistance determinants. **J Med Microbiol**, v.59, n. 11, p.1331-9, 2010.
- BLIN, C.; PASSET, V.; TOUCHON, M.; ROCHA, E. P. C; BRISSE, S. Metabolic diversity of the emerging pathogenic lineages of *Klebsiella pneumoniae*. **Environmental Microbiology** (2017) 19(5), 1881–1898.
- BOUZA, E.; CERCENADO, E. *Klebsiella* and enterobacter: antibiotic resistance and treatment implications. **Semin Respir Infect**, v. 17, n. 3, p. 215-30, 2002.
- BREUREC, S. et al. Liver abscess caused by infection with community-acquired *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *Quasipneumoniae*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 3, p. 529–531, 2016.
- BRINKAC, L.M., WHITE, R., D’SOUZA, R., NGUYEN, K., OBARO, S. K., FOUTS, D.E. Emergence of New Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM-5) in *Klebsiella quasipneumoniae* from Neonates in a Nigerian Hospital. **mSphere**, 4 (2) e00685-18, 2019.
- BRISSE, S.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A D. The Genus *Klebsiella* Taxonomic History and Structure. **The Prokaryotes**, p. 159–196, 2006.
- BRISSE, S.; PASSET, V.; GRIMONT, P. A. D. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., Isolated from human infections, With two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 2014, p. 3146–3152, 2014.

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.**, v. 51, n. 3, p. 915–924, 2001.

CHENG, V. C. C. et al. Epidemiology of *Klebsiella oxytoca*-associated diarrhea detected by Simmons citrate agar supplemented with inositol, tryptophan and bile salts. **Journal of Clinical Microbiology**, fev. 2012.

CLSI - **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. [s.l: s.n.]. v. 26, 2015.

CRUZ, C. B. N. DA et al. Virulence factors associated with pediatric shigellosis in Brazilian Amazon. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

DIANCOURT, L. et al. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4178–4182, 2005.

DINI, V. S. Q. **ANÁLISE DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS EM UNIDADES DE TRATAMENTO INTENSIVO EM MANAUS**. Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, 2016, 135p.

FAUVET T, TARANTOLA A, COLOT J, MERLET A, GOARANT C, MAROT B, SÉRIE M. Mucoviscous characteristics of *Klebsiella pneumoniae* strains: A factor of clinical severity, *Med Mal Infect*, S0399-077X (18) 30054-4. doi: 10.1016/j.medmal.2019.06.006. [Epub ahead of print], 2019.

FEVRE, C. et al. Variants of the *Klebsiella pneumoniae* OKP chromosomal beta-lactamase are divided into two main groups, OKP-A and OKP-B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 5149–5152, 2005.

FONSECA, E. L. et al. A one-step multiplex PCR to identify *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae* in the clinical routine. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 4, p. 315–317, 2017.

FOX, S. Health Topics. **Pew Internet & American Life Project**, p. 1–2, 2011.

FUURSTED, K.; SCHUMACHER, H. Significance of low-level resistance to ciprofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and the effect of increased dosage of ciprofloxacin in vivo using the rat granuloma pouch model. **J Antimicrob Chemother.** v.50, n.3, p. 421-4,2002.

GARZA-RAMOS, U. et al. Draft Genome Sequence of a Hypermucoviscous Extended-Spectrum- beta-Lactamase-Producing *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* Clinical Isolate. **Genome Announcements**, v. 4, n. 4, p. e00475-16, 2016.

GHEBREYESUS, T. **High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/en/>>. Acesso em: 1 fev. 2018.

GOALS, M. D.; GOALS, S. D. Media centre Antimicrobial resistance. p. 1–5, 2018.

GONTIJO-FILHO, P. P.; GALES, A. C. Brief communication Emergence of *Klebsiella pneumoniae* - producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 577–580, 2012.

GUERIN, F. et al. Bloody diarrhea caused by *Klebsiella pneumoniae*: a new mechanism of bacterial virulence? **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 27, p. 648–649, 1998.

HENDRIK, T. C.; VOOR IN 'T HOLT, A. F.; VOS, M. C. Clinical and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella* spp.: A Systematic Review and Meta-Analyses. **Plos One**, v. 10, n. 10, p. e0140754, 2015.

HUYNH, D. T. N.; KIM, A. Y.; KIM, Y. R. Identification of Pathogenic Factor sin *Klebsiella pneumoniae* Using Impedimetric Sensor Equipped with Biomimetic Surfaces. **Sensors (Basel)**, v. 17, n.6, p. E1406, 2017.

KIM, J.; JO, A.; CHUKEATIROTE, E.; AHN, J. Assessment of antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* exposed to sequential in vitro antibiotic treatments. **Ann Clin Microbiol Antimicrobial**, v. 15, n. 60, p. 1-7, 2016.

LIU, L.; FENG, Y.; TANG, G.; LIN, J.; HUANG, W.; QIAO, F.; ZONG, Z. Carbapenem-resistant Isolates of the *Klebsiella pneumoniae* Complex in Western China: The Common ST11 and the Surprising Hospital-specific Types. **Clin Infect Dis**. V.13, n.67, p.S263-S265, 2018.

LIVRELLI, V.; DE CHAMPS, C.; DI MARTINO, P.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; FORESTIER, C.; JOLY, B. Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 8, p. 1963-9, 1996.

MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and MARTÍNEZ-ROMERO, E.; RODRÍGUEZ-MEDINA, N.; BELTRÁN-ROJEL, M.; TORIBIO-JIMÉNEZ, J.; GARZA-RAMOS, U. *Klebsiella variicola* and *Klebsiella quasipneumoniae* with capacity to adapt to clinical and plant settings. **Salud Publica Mex**, v. 60, n. 1, p.29-40, 2018.

MATHERS, A. J.; CROOK, D.; VAUGHAN, A.; BARRY, K. E.; VEGESANA, K.; STOESSER, N.; PARIKH, H. I.; SEBRA, R.; KOTAY, S.; WALKER, A. S.; SHEPPARD, A. E. *Klebsiella quasipneumoniae* Provides a Window into Carbapenemase Gene Transfer, Plasmid Rearrangements, and Patient Interactions with the Hospital Environment. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 63, n. 6, p. e02513-18, 2019.

OLIVEIRA, C. B. S. DE et al. Frequência e perfil de resistência de *Klebsiella* spp. em um hospital universitário de Natal / RN durante 10 anos Frequency and resistance profile of *Klebsiella* spp. isolates in a university hospital in Natal/RN during a ten-year period. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 6, p. 589–594, 2011.

OSSEIRAN, N.; CHIRSCADEN, K. **The cost of a polluted environment: 1. 7 million child deaths a year, says WHO.**

OZER, E. A. et al. Draft Genome Sequence of a Multidrug-Resistant *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* Isolate from a Clinical Source. **Genome Announcements**, v. 4, n. 3, p. e00422-16, 2016.

OZER, E.A.; MORRIS, A.R.; KRAPP, F.; HENRY, C.S.; TYO, K. E.; LATHEM, W. W.; HAUSER, A. R. Draft Genome Sequence of a Multidrug-Resistant *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* Isolate from a Clinical Source. **Genome Announc**, v.4, n. 3, p. e00422-16, 2016.

Pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

PASSET, V.; BRISSE, S. Description of *Klebsiella grimontii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 377–381,2018.

PERLMAN, E.; JM, B. Primary bacillus friedländer (*Klebsiella pneumoniae*) pneumonia: Therapy of b. friedländer b pneumonia. **Archives of Internal Medicine**, v. 67, n. 5, p. 907–920, 1 maio 1941.

PITOUT, J. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 10, p. 5873-84,2015.

RAMOS, N. V. **Caracterização genética da resistência aos betalactâmicos e taxonomia de isolados do gênero *Klebsiella***. Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2014,58 p.

RICE, L. B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 8, p. 1079–1081, 2008.

RIVERO, A.; GOMEZ, E.; ALLAND, D.; HUANG, D. B.; CHIANG, T. K2 serotype *Klebsiella pneumoniae* causing a liver abscess associated with infective endocarditis. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 2, p. 639-412010.

RODRIGUES C, PASSET V, RAKOTONDRA SOA A, BRISSE S. Identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* and Related Phylogroups by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Front Microbiol**. 2018; 9: 3000.

ROMERO, E. D. et al. Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. producing multiple extended-spectrum beta-lactamases. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 59, n. 4, p. 433–437, 2007.

ROSENBLUETH, M. et al. *Klebsiella variicola*, A Novel Species with Clinical and Plant-Associated Isolates. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 27–35, 2004.

RUDAN, I.; BOSCHI-PINTO, C.; BILOGLAV, Z. Bulletin of the World Health Organization. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. **B World Health Organ**, p. 1–14, 2008.

SAHLY, H.; PODSCHUN, R.; OELSCHLAEGER, T. A.; GREIWE, M.; PAROLIS, H.; HASTY, D.; KEKOW, J.; ULLMANN, U.; OFEK, I.; SELA, S. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 68, n. 12, p. 6744-9, 2000.

SHANKAR, C. et al. Draft genome of a hypervirulent *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* with novel sequence type ST2320 isolated from a chronic liver disease patient. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 9, n. 2010, p. 30–31, 2017.

SHON, A. S.; BAJWA, R. P. S.; RUSSO, T. A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 107–118, 2013.

SINGH AK, YADAV S, CHAUHAN BS, NANDY N, SINGH R, NEOGI K, ROY JK, SRIKRISHNA S, SINGH RK AND PRAKASH P. Classification of Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Based on Their *in vitro* Biofilm Forming Capabilities and Elucidation of the Biofilm Matrix Chemistry with Special Reference to the Protein Content. **Front. Microbiol.** 10:669, 2019.

SRINIVASAN, S.; SALDANHA, J.; ABHYANKAR, S.; MODI, N.; PATIL, A.; VARTAK, A. M. Antibiotic sensitivity pattern of *Klebsiella* species in burn wounds at Bai Jerbai Wadia hospital for children, Mumbai, India-a 21year study. **Int J Burns Trauma**, v.7, n. 5, p.64-71, 2017

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v.33, n. 9, p. 2233-9, 1995.

ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. v. 11, n. 4, p. 589–603, 1998a.

WHO. **Diarrhoea**. Disponível em: <http://www.who.int/topics/diarrhoea/en/>, 2017.

XIE, Y.; TIAN, L.; LI, G.; QU, H.; SUN, J.; LIANG, W.; LI, X.; WANG, X.; DENG, Z.; LIU, J.; OU, H. Y. Emergence of the third-generation cephalosporin-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* due to the acquisition of a self-transferable bla (DHA-1)-carrying plasmid by an ST23 strain. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 838-844, 2018.

YAMADA, M. et al. A Pediatric Case of Antibiotic-Associated Hemorrhagic Colitis Caused by *Klebsiella Oxytoca*. **Global Pediatric Health**, v. 1, n. 0, p. 2014–2016, 2014.

YORK, N. E. W. et al. Media centre 7 000 newborns die every day, despite steady decrease in under-five mortality, new report says. p. 1–4, 2018.

9. ANEXOS

9.1 Anexo 1 - Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM

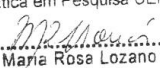


PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com o número 266/2006, intitulado: “**Caracterização fenotípica e genotípica dos enteropatógenos isolados de crianças de 0-10 anos de idade, com diarreia aguda e de repetição na região de Manaus-Amazonas**”. Tendo como Pesquisadora Responsável Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 15 de março de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFAM


.....
Prof.ª Dr.ª Maria Rosa Lozano Borrás
Coordenadora



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEEA



UFAM

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Protocolo nº 104/2012-CEEA/UFAM, intitulado como "Análise investigativa dos fatores de virulência de Cepas selvagens de *Shingella sp.* *In vivo* e seu potencial inflamatório" sob responsabilidade e orientação de **Dra. Patrícia Puccinelli Oriandi**, está de acordo com a Legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM) em Reunião ocorrida em 11/01/2013.

Manaus, 26 de junho de 2013.

Prof. Dra. Cintya Iamile Fritzh Brandão de Oliveira
Diretora em exercício do Biotério Central da UFAM
Portaria 1561/2013- Gabinete da Reitoria, de 30 de abril de 2013

9.2 Anexo 2 - Leitura meiosbioquímicos

9.2.1 MeioEPM

A verificação de fermentação da glicose com produção de gás foi realizada por meio do teste EPM (Escola Paulista de Medicina) via enzima hidrogenilase fórmica durante a fermentação da glicose, evidenciado pela formação de bolhas que podem formar rachaduras ou deslocamento do meio no tubo. A identificação da produção de H₂S, que acontece pela ação da enzima tiosulfato-redutase agindo sobre o tiosulfato de sódio, é evidenciado pela reação do citrato férrico amoniacal, que formará sulfeto de sódio insolúvel na cor negra. A hidrólise da ureia ocorre pela enzima uréase que cliva a ureia em CO₂ e NH₃, como resultado desta reação forma-se carbonato de amônia alcalinizando o meio sendo visível pela coloração azul na basedo meio. Por fim a desaminação do aminoácido triptofano ocorre pela enzima L-triptofano desaminase (LTD) que promove a desaminação oxidativa do aminoácido L-triptofano convertendo em ácido indol-pirúvico que reage com os sais de ferro formando um composto na cor verde escura ou verde garrafa no topo do meio (TRABULSI et al., 2008).

9.2.2 MeioMILi

A motilidade é observada pelo crescimento da bactéria além da linha da picada, turvando parcial ou totalmente o meio. As bactérias imóveis crescem apenas na linha da picada. A descarboxilação da Lisina surge pela enzima lisina descarboxilase que remove CO₂ da lisina produzindo a cadaverina alcalinizando o meio que adquire cor púrpura em toda a sua extensão. Quando o meio permanece roxo é considerado positivo paralisina, se negativo ele modifica a coloração para amarelo. O indol é produzido pela triptofanase que age sobre o triptofano liberando indol, que é observado com a adição do reativo de Kovacs e de Ehrlich, produzindo uma coloração vermelha, sendo considerado positivo, se negativo ele permanece na cor amarela do reagente (TRABULSI et al., 2008).

9.2.3 Citrato

O citrato de sódio é um composto orgânico simples encontrado como um dos metabólitos do ciclo de Krebs. Algumas bactérias, como a *Klebsiella*, obtêm energia utilizando o citrato de sódio e o fosfato de amônia como única fonte de carbono e nitrogênio produzindo amônia alcalinizando o meio e pelo indicador de pH azul de bromotimol, evidenciando a reação positiva com o aparecimento da coloração azul na superfície do meio (TRABULSI et al., 2008).