

Universidade Federal do Rio de Janeiro

PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DOS GÊNEROS

Klebsiella E Raoultella

Maria Silvana Alves

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DOS GÊNEROS

Klebsiella E Raoultella

Maria Silvana Alves

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Microbiologia
Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do
título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Orientadores: Prof. Beatriz Meurer Moreira

Prof. Angela Christina Dias de Castro

Rio de Janeiro

Abril/2006

PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DOS GÊNEROS

Klebsiella E Raoultella

Maria Silvana Alves

Orientadores: Prof. Beatriz Meurer Moreira

Prof. Angela Christina Dias de Castro

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Aprovada por:

Presidente, Prof. Leila de Souza Fonseca, UFRJ

Prof. Adriana Marcos Vivoni, UFRJ

Prof. Rosana Rocha Barros, UFF

Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza, UFRJ

Prof. Beatriz Meurer Moreira, UFRJ

Rio de Janeiro

Abril/2006

Alves, Maria Silvana.

Proposta de identificação de amostras dos gêneros *Klebsiella* e *Raoultella*/ Maria Silvana Alves. Rio de Janeiro: UFRJ/ IMPPG, 2006.

xvii 123f.: il., 31 cm

Orientadores: Beatriz Meurer Moreira e Angela Christina Dias de Castro

Tese (doutorado) – UFRJ/Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2006.

Referências bibliográficas: f. 69-86.

1. *Klebsiella* 2. *Raoultella* 3. *rpoB* 4. Identificação fenotípica 5. Genotipagem – I. Moreira, Beatriz Meurer e Castro, Angela Christina Dias de (Orient.).

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof.

Paulo de Góes. III. Título

A Deus, fonte de toda sabedoria.

A meus pais, João Alves Filho e Maria Rosa de Oliveira Alves, cujos exemplos de força e determinação têm sido uma constante em minha vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu grande parceiro, Zelimar Martins Coelho de Lima, pela paciência e compreensão nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Beatriz Meurer Moreira, minha orientadora e amiga, pelo apoio, estímulo e confiança, vitais para a realização deste trabalho;

À Prof. Angela Christina Dias de Castro, minha co-orientadora, pelo apoio e dedicação;

À Prof. Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues, pelo grande incentivo a minha carreira científica;

Ao Prof. Geraldo Renato de Paula, pelo enorme estímulo à realização do meu doutorado (devo a ele o prazer de ter conhecido minha orientadora);

Ao Prof. Lee W. Riley, pela infra-estrutura cedida no Department of Infectious Diseases, School of Public Health, University of California at Berkeley, e pelo apoio financeiro que permitiram a conclusão do presente trabalho;

A toda equipe do Laboratório de Epidemiologia das Infecções Bacterianas pelo incentivo, companheirismo e sincera amizade. Saibam que todos moram, igualmente, em meu coração;

Ao Sr. Marlei Gomes da Silva, pelo auxílio técnico no preparo de meios artesanais e reagentes e, em especial, por sua preciosa amizade;

À Ana Carolina da Silva Carvalho, Ana Carolina Mesquita Rocha, Carla Dray Marassi, Eliane de Oliveira Ferreira, Juliana Magalhães Vital Brazil, Paula Carvalhal Lage Von Buettner Ristow, minhas queridas companheiras do curso de Pós-Graduação em Ciências – Microbiologia, e à Dra. Adriana Marcos Vivoni e Dra. Sherry Smith, pelo apoio nos momentos difíceis e pelo ombro amigo sempre disponível;

Ao Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, na pessoa de seu chefe Prof. Renê Gonçalves de Matos, pela minha liberação para capacitação;

À Direção da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, na pessoa de seu diretor Prof. Lúcio Guedes Barra, pelo incentivo a minha capacitação;

À farmacêutica-bioquímica Maria de Lourdes Junqueira, pela preciosa colaboração no armazenamento das amostras bacterianas investigadas;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a CAPES, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Fogarty International Program in Global Infectious Diseases (TW006563) of the National Institute of Health, pelo apoio financeiro que tornou possível a realização do presente trabalho;

Ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG) na pessoa de sua diretora Prof. Angela Hampshire de Carvalho Santos Lopes;

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação do IMPPG, na pessoa de sua coordenadora Prof. Thaís Cristina Baeta Soares Souto Padrón;

À Prof. Agnes Marie Sá Figueiredo, chefe do Departamento de Microbiologia Médica do IMPPG;

A todos aqueles que têm no seu íntimo a consciência de terem realmente contribuído para a minha formação.

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro e na School of Public Health, University of California at Berkeley, EUA, sob a orientação da Prof. Beatriz Meurer Moreira e Prof. Angela Christina Dias de Castro.

“Não, não pares.

É graça divina começar bem. Graça maior persistir na caminhada certa, manter o ritmo...

Mas a graça das graças é não desistir, podendo ou não podendo, caindo embora aos pedaços, chegar até o fim.”

D. Hélder Câmara

RESUMO

PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DOS GÊNEROS *Klebsiella* E *Raoultella*

Maria Silvana Alves

Orientadores: Prof. Beatriz Meurer Moreira
Prof. Angela Christina Dias de Castro

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

A estrutura filogenética do gênero *Klebsiella* tem sido motivo de estudos recentes, evidenciando-se uma grande heterogeneidade taxonômica, que levou à proposição de um novo esquema para sua classificação, à descrição de novas espécies e à criação do gênero *Raoultella*. Os objetivos do presente estudo foram o de caracterizar, utilizando testes fenotípicos convencionais e adicionais e testes moleculares, uma coleção recente de amostras bacterianas previamente identificadas como *Klebsiellae* no laboratório clínico de origem e detectar amostras produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) através do teste de disco-sinergismo (CLSI). As amostras foram obtidas de pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU/UFJF), um hospital público terciário com 131 leitos localizado na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais. Um total de 122 amostras obtidas de diferentes espécimes clínicos de 120 pacientes no período de março de 2002 a março de 2004, foi incluído no presente estudo e avaliado em 16 testes fenotípicos convencionais e quatro suplementares. Deste total, 102 (84%) amostras foram identificadas como *Klebsiella pneumoniae* ou *Klebsiella variicola* (Kp/Kv), 19 (15%) como *Klebsiella oxytoca* e uma (1%) como *Raoultella planticola*. A produção de ESBL foi observada em 29 (28%) das 102 amostras de Kp/Kv (incluindo três *K. variicola*) e 9 (47%) de 19 *K. oxytoca*. *R. planticola* foi ESBL negativa e resistente somente à ampicilina. Amostras representativas dos três grupos fenotípicos foram submetidas à tipagem molecular através de ERIC2-PCR e ao seqüenciamento do gene *rpoB*, que codifica a produção da subunidade β da RNA polimerase. A tipagem molecular revelou diversidade genotípica nos grupos estudados. Os resultados obtidos no seqüenciamento do gene *rpoB* confirmaram a identificação fenotípica e permitiram a detecção de *K. variicola* entre amostras de Kp/Kv. No presente estudo ficou evidenciada a limitação dos testes fenotípicos para a identificação da espécie *K. variicola*. Portanto, para a melhor compreensão da epidemiologia das infecções bacterianas causadas por este grupo bacteriano, testes fenotípicos e moleculares se fazem necessários.

Palavras-chave: *Klebsiella*, *Raoultella*, *rpoB*, identificação fenotípica, genotipagem.

Rio de Janeiro
Abril/2006

ABSTRACT

A PROPOSAL TO THE IDENTIFICATION OF *Klebsiella* AND *Raoultella* ISOLATES**Maria Silvana Alves**Orientadores: Prof. Beatriz Meurer Moreira
Prof. Angela Christina Dias de Castro

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

The genus *Klebsiella* has recently been reanalyzed regarding its phylogenetic structure. All studies performed to date have shown the taxonomic heterogeneity of this organism, and a new genus has been proposed (*Raoultella*) for part of these isolates. The aim of the present study was to identify to the species level a collection of sequential isolates from inpatients and outpatients from Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU – UFJF), a teaching hospital located in the city of Juiz de Fora, in Minas Gerais, and to detect ESBL-producing isolates by a disk-synergism test (CLSI). We used 16 conventional biochemical tests and 4 supplementary tests to evaluate 122 isolates initially identified as *Klebsiellae* at the original laboratory, obtained from different clinical specimens of 120 patients between March 2002 and March 2004. A total of 102 (84%) isolates were identified as *Klebsiella pneumoniae* or *Klebsiella variicola* (Kp/Kv), 19 (15%) as *Klebsiella oxytoca*, and one isolate (1%) as *Raoultella planticola*. A sample of isolates of the three phenotypic groups was further characterized by ERIC2-PCR typing and by sequencing of the *rpoB* gene, which encodes the β subunit of RNA polymerase. Strain typing revealed genotypic diversity of all groups. Sequencing of the *rpoB* gene confirmed the phenotypic identification and detected *K. variicola* among Kp/Kv. ESBL production was detected in 29 (28%) of 102 Kp/Kv, including three of five *K. variicola* isolates and 9 (47%) of 19 *K. oxytoca* isolates. The *R. planticola* isolate was ESBL negative and resistant only to ampicillin. In the present study, the limitation of the phenotypic tests for the correct identification of *Klebsiella variicola* isolates was evidenced. Therefore, for the best understanding of the epidemiology of the infections caused by this bacterial group, phenotypic and molecular tests are presently necessary.

Key-words: *Klebsiella*, *Raoultella*, *rpoB*, phenotypic identification, typing.

Rio de Janeiro
Abril/2006

SUMÁRIO

	Página
Introdução	1
1. Taxonomia do gênero <i>Klebsiella</i>	1
2. Caracterização fenotípica de amostras de Klebsiellae	6
3. Resistência aos antimicrobianos e produção de β -lactamases	10
4. Caracterização genotípica de amostras de Klebsiellae	15
5. Justificativa	18
Objetivos	20
Material e Métodos	21
1. Desenho do estudo	21
2. Período do estudo	21
3. Aspectos éticos	21
4. Amostras avaliadas	22
5. Amostras-controle	22
6. Caracterização fenotípica das amostras de Klebsiellae	23
6.1 Inclusão de amostras de Klebsiellae nos gêneros <i>Klebsiella</i> e <i>Raoultella</i>	24
6.1.1. Observação das características morfológicas das colônias em Ágar MacConkey	25
6.1.2. Observação das características morfotintoriais das amostras	25
6.1.3. Teste da oxidase	26
6.1.4. Teste de fermentação de carboidratos (glicose e lactose ou sacarose) e produção de gás e H ₂ S em meio TSI	26
6.1.5. Teste de motilidade e produção de indol em meio SIM	27
6.1.6. Vias de metabolismo da glicose – Vermelho de Metila e reação de Voges-Proskauer	28
6.1.7. Utilização de citrato em Ágar Citrato de Simmons	29
6.1.8. Teste da descarboxilação de aminoácidos (arginina, lisina e ornitina)	29
6.1.9. Teste de desaminação da fenilalanina	30
6.1.10. Produção de urease em Ágar Uréia de Christensen	30
6.1.11. Teste de utilização do malonato	31
6.1.12. Teste de fermentação do adonitol	31
6.1.13. Teste de crescimento a 10°C	32
6.1.14. Teste de utilização de L-sorbose	32
6.2. Identificação das espécies de Klebsiellae	33
6.2.1. Teste de assimilação de carbono (histamina e D-melezitose)	33
7. Susceptibilidade aos antimicrobianos	36
7.1. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e triagem para a produção de ESBL	36
7.2. Teste de disco adição com ácido clavulânico	37
8. Caracterização genética das amostras de Klebsiellae	37
8.1. Extração de DNA	38
8.2. Amplificação do gene <i>rpoB</i>	38
8.3. Análise das seqüências do gene <i>rpoB</i>	39

9. Genotipagem	40
9.1. Preparação do DNA	41
9.2. Condições de amplificação	41
9.3. Interpretação dos resultados	42
Resultados	43
1. Amostras bacterianas	43
2. Caracterização fenotípica das amostras	43
3. Análise das seqüências do gene <i>rpoB</i>	44
4. Genotipagem	46
5. Susceptibilidade aos antimicrobianos e produção de ESBL	48
Discussão	57
Conclusões	67
Proposta	68
Referências bibliográficas	69
Anexos – Publicações científicas	87
Artigo 1: Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative <i>Klebsiella</i> spp.	88
Artigo 2: A case of severe pancreatitis complicated by <i>Raoultella planticola</i> infection	116

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

β: beta

°C: graus Celsius

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNAr 16S: DNA ribossômico 16S

dNTP: desoxinucleotídeo 5'-trifosfatado

ERIC: seqüências consenso intergênicas repetitivas de enterobactérias (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*)

ESBL: beta-lactamase de espectro estendido

g: grama

gyrA: gene que codifica a subunidade A da DNA girase

HU/UFJF: Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora

IMPPG: Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes

infB: gene que codifica o fator 2 de início da tradução

KpESBL: *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL

LB: meio de Luria Bertani

LDG: leite desnatado-glicerol

mdh: gene que codifica a malato desidrogenase

mm: milímetro

mL: mililitro

μg: micrograma

μL: microlitro

μM: micromolar

nifH: gene que codifica a nitrogenase redutase

parC: gene que codifica a subunidade C da topoisomerase IV

pb: pares de bases

PBS: tampão salina-fosfato (*phosphate buffer saline*)

PCR: reação da polimerase em cadeia

PFGE: eletroforese em gel de campo pulsado

pH: potencial hidrogeniônico

phoE: gene que codifica uma porina fosfatada

RAPD: polimorfismo de DNA amplificado de forma aleatória (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

RNAr 16S: ácido ribonucléico ribossômico 16S

rpoB: gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase

SIM: ágar sulfeto-indol-motilidade

Taq: *Thermus aquaticus*

TSB: *Trypticase Soy Broth*

TSI: ágar tríplice açúcar-ferro

UV: ultravioleta

VM: vermelho de metila

VP: Voges-Proskauer

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Tabela 1. Testes bioquímicos utilizados na diferenciação de espécies e subespécies dos gêneros <i>Klebsiella</i> e <i>Raoultella</i> .	35
Tabela 2. Resultados dos testes de identificação utilizados na diferenciação de 122 amostras de <i>Klebsiellae</i> .	50
Tabela 3. Perfis de resistência antimicrobiana de 121 amostras de <i>Klebsiellae</i> .	51
Figura 1. Árvore filogenética obtida com seqüências parciais do <i>rpoB</i> (512 pb) de 47 amostras de <i>Klebsiellae</i> e amostras-padrão construída pelo método de <i>neighbor-joining distance</i> , usando Jukes & Cantor como parâmetro modelo. Os números dentro do dendrograma indicam a ocorrência (%) de repetições das ramificações em 100 vezes (valores de <i>bootstrap</i>). Apenas valores acima de 50 são mostrados. A escala de barra indica divergência de 2%. As setas indicam os grupos Kp, Kv, Rp/Ro e Ko. Os grupos filogenéticos de <i>K. pneumoniae</i> são KpI, KpII-B e KpIII e os de <i>K. oxytoca</i> são KoI, KoII, KoIV e KoVI.	52
Figura 2. Perfis de bandas obtidos com amostras de <i>Klebsiellae</i> , gerados pela técnica de amplificação de fragmentos de DNA em reação em cadeia da polimerase utilizando iniciador para seqüências conservadas intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR).	53
Figura 3. Dendrograma realizado a partir dos perfis de bandas obtidos pela técnica de ERIC-PCR para as amostras de <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. variicola</i> e <i>R. planticola</i> seqüenciadas.	54
Figura 4. Dendrograma realizado a partir dos perfis de bandas obtidos pela técnica de ERIC-PCR para as amostras de <i>K. oxytoca</i> e <i>R. planticola</i> seqüenciadas.	55

INTRODUÇÃO

1. TAXONOMIA DO GÊNERO *Klebsiella*

O gênero *Klebsiella*, nome dado em homenagem ao bacteriologista alemão Edwin Klebs, foi originalmente classificado de acordo com sua importância médica em *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae* e *Klebsiella rhinoscleromatis*, responsáveis, respectivamente, por quadros de pneumonia, rinite atrófica crônica (ozena) e lesão ulcerativa destrutiva crônica de nasofaringe ou doença granulomatosa do nariz (rinoscleroma), conforme apresentado em extensas revisões sobre o assunto realizadas por Podschun & Ullmann, em 1998, e Martínez e colaboradores, em 2004. Entretanto, de acordo com a oitava edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, com base nas características fenotípicas e nos resultados obtidos em estudos de hibridização DNA-DNA, este gênero foi reorganizado em cinco espécies denominadas de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella ornithinolytica* e *Klebsiella planticola*, sendo que a espécie *K. pneumoniae* passou a compreender três subespécies: *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subespécie *ozaenae* e *K. pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis* (Ørskov, 1984). Porém, com a utilização cada vez mais intensa das técnicas de hibridização do DNA, bem como de estudos moleculares adicionais a essa hibridização, novas espécies foram descritas e outras reclassificadas.

Carter e colaboradores (1999), fundamentados em estudos mais completos das seqüências de nucleotídeos do RNA ribossômico 16S (RNAr 16S) e do gene que codifica uma porina fosfatada (*phoE*), propuseram a transferência da espécie *Calymmatobacterium*

granulomatis, agente etiológico da Donovanose, para o gênero *Klebsiella*. Entretanto, estes autores consideraram que não existiam ainda dados suficientes para definir se *Calymmatobacterium granulomatis* deveria ser incluída como uma nova espécie do gênero *Klebsiella*, ou como uma nova subespécie de *K. pneumoniae*. Apesar de Rosenblueth e colaboradores (2004) terem sugerido que *K. granulomatis* possa ser uma subespécie de *K. pneumoniae*, no presente estudo, adotamos a nomenclatura *Klebsiella granulomatis*, utilizada por Carter e colaboradores (1999).

A partir do ano de 2001, a taxonomia do gênero *Klebsiella* passou a ser investigada por vários autores. Em 2001, Brisse & Verhoef realizaram um estudo filogenético com os objetivos de descrever a estrutura genética intra-específica de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* e explorar o relacionamento filogenético entre essas espécies e outras espécies e subespécies de *Klebsiella*. Estes autores empregaram uma combinação de análise do polimorfismo de segmentos do DNA amplificado de forma aleatória (*Random Amplified Polymorphic DNA* – RAPD), de ribotipagem automatizada e do seqüenciamento dos genes que codificam a subunidade A da DNA girase (*gyrA*) e a subunidade C da topoisomerase IV (*parC*), duas proteínas que correspondem aos principais alvos de ação das fluoroquinolonas em *Klebsiella*. Neste estudo, foram analisadas 120 amostras de origem clínica (86 amostras de *K. pneumoniae*, 30 de *K. oxytoca* e quatro de *K. planticola*) procedentes de 23 hospitais universitários localizados em 13 países europeus e oito amostras-padrão que permitiram observar um alto grau de variabilidade para as três espécies estudadas. Pela análise dos resultados do RAPD foram detectados 70 genótipos distintos de *K. pneumoniae* e genótipos distintos para cada amostra de *K. oxytoca* e cada amostra de *K. planticola*. Com base nestes resultados, os autores propuseram a organização dos microrganismos em seis grupos: KpI, KpII e KpIII, para a espécie *K. pneumoniae*, sendo KpI o principal deles; KoI e KoII para

K. oxytoca e um grupo (Kplan) para *K. planticola*. Os dados das seqüências dos genes *gyrA* e *parC* e ribotipagem obtidos por Brisse & Verhoef (2001) revelaram, ainda, uma proximidade genética importante entre a cepa *K. ornithinolytica* ATCC 31898 e as amostras de *K. planticola*, incluindo a cepa *K. planticola* ATCC 33531. Esta evidência foi considerada sugestiva de que *K. ornithinolytica* pertenceria, de fato, à espécie *K. planticola*. Entretanto, ainda não está definido se *K. ornithinolytica* é um grupo independente ou se pertence à espécie *K. planticola* (atualmente *Raoultella planticola*) (Martínez *et al.*, 2004).

Neste mesmo ano de 2001, com base nas seqüências de nucleotídeos de RNAr 16S e do gene que codifica a subunidade beta (β) da RNA polimerase (*rpoB*), Drancourt e colaboradores (2001) propuseram que as espécies do gênero *Klebsiella* fossem incluídas em dois gêneros, *Klebsiella* e *Raoultella*, e que *K. oxytoca* fosse considerada uma espécie monofilética que aguardaria definição de nova nomenclatura. Segundo esta proposta de classificação, o gênero *Klebsiella* incluiria apenas as espécies *K. pneumoniae*, com suas três subespécies: *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subespécie *ozaenae* e *K. pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis*, e a espécie *K. granulomatis*, descrita por Carter e colaboradores em 1999. Ainda segundo Drancourt e colaboradores (2001), o gênero *Raoultella* incluiria as espécies: *R. planticola*, *Raoultella ornithinolytica* e *Raoultella terrigena*. Este novo gênero poderia ser caracterizado de forma fenotípica por dois testes suplementares àqueles convencionais para enterobactérias: a capacidade de crescimento a 10°C e de utilização de L-sorbose, ambos positivos para espécies de *Raoultella*. Estes autores propuseram ainda a organização de oito amostras-padrão analisadas em três grupos: o grupo I, incluindo as subespécies de *K. pneumoniae* (*K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subespécie *ozaenae*, *K. pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis*) e *K. granulomatis*; o grupo II, as espécies do novo gênero

Raoultella (*R. planticola*, *R. ornithinolytica* e *R. terrigena*); e o grupo III, *K. oxytoca*.

Em 2003, Boye & Hansen efetuaram novo estudo fundamentado no seqüenciamento do RNAr 16S. Nesta investigação, estes pesquisadores seqüenciaram 17 amostras de *Klebsiella* (incluindo seis amostras-padrão), duas de *Enterobacter* (incluindo *Enterobacter cloacae* ATCC 1304) e uma de *Pantoea agglomerans* e, com base nas seqüências obtidas, construíram uma árvore filogenética juntamente com outras seqüências já publicadas de *Enterobacteriaceae* e depositadas no EMBL *Nucleotide Sequence Database* (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>). Neste estudo, os resultados obtidos revelaram a presença de cinco grupos dentro do antigo gênero *Klebsiella*, e não três, como anteriormente descrito por Drancourt e colaboradores (2001). Os grupos foram organizados da seguinte forma: Grupo I, incluindo *K. oxytoca*; Grupo II, *K. terrigena*; Grupo III, *K. planticola* e *K. ornithinolytica*; Grupo IV, *Enterobacter aerogenes* (também denominada *Klebsiella mobilis*, em <http://www.bacterio.cict.fr>, acessado em fevereiro de 2006); e Grupo V, *K. pneumoniae* sensu lato. Boye e Hansen (2003) também observaram a posição de *C. granulomatis* dentro do gênero *Klebsiella* e relacionada à *K. pneumoniae* (Grupo V). Entretanto, estes autores julgaram prematuro o estabelecimento de conclusões definitivas sobre o número de entidades filogenéticas dentro do gênero *Klebsiella* e recomendaram a realização de novos estudos de hibridização DNA-DNA ou de seqüenciamento de vários genes essenciais para a manutenção do metabolismo celular (conhecidos como *housekeeping genes*) para a elucidação desta questão.

Em seguida, nos meses de fevereiro e novembro de 2004, foram descritas duas novas espécies do gênero *Klebsiella*: *Klebsiella variicola* (Rosenblueth *et al.*, 2004) cuja nomenclatura foi validada por Euzéby (2004), correspondente ao grupo III de *K. pneumoniae* (KpIII) (Brisse & Verhoef, 2001), e *Klebsiella singaporensis* (Li *et al.*, 2004).

A descrição de *K. variicola* fundamentou-se na análise das seqüências dos genes *rpoB*, *gyrA*, *mdh* (codifica a malato desidrogenase), *infB* (codifica o fator 2 de início da tradução), *phoE* e *nifH* (codifica a nitrogenase redutase) (Rosenblueth *et al.*, 2004). A proposta da espécie *K. singaporensis* baseou-se nas seqüências do RNAr 16S e do *rpoB* (Li *et al.*, 2004).

Subgrupos dentro de espécies de Klebsiellae também foram determinados. Em 2005^a, Fevre e colaboradores demonstraram a inclusão de amostras de *K. oxytoca* em cinco grupos filogenéticos distintos (KoI, KoII, KoIII, KoIV e KoVI), os quais puderam ser identificados pelo seqüenciamento dos genes RNAr 16S, *rpoB*, *gyrA*, *gapDH* (codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e *bla_{OXY}* (codifica uma β -lactamase de classe A denominada OXY). Em dezembro deste mesmo ano, Fevre e colaboradores (2005^b), fundamentados na análise das seqüências dos genes *rpoB*, *gyrA*, *mdh* e *bla_{OKP}* (gene cromossômico que codifica uma β -lactamase denominada OKP), descreveram a subdivisão de amostras de *K. pneumoniae* pertencentes ao grupo filogenético KpII (Brisse & Verhoef, 2001), em dois subgrupos denominados KpII-A e KpII-B, os quais correspondem aos subgrupos *bla_{OKP-A}* e *bla_{OKP-B}*.

Finalmente, seqüências do RNAr 16S para duas novas espécies supostas, *Klebsiella milletis* e *Klebsiella senegalensis*, foram depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, acessado em fevereiro de 2006) mas, até o presente, não foi publicada nenhuma descrição dos dados referentes a estas propostas.

Assim sendo, o desenvolvimento recente de ferramentas moleculares tem levado a revisões taxonômicas ou a propostas seguras de novas espécies (Martínez *et al.*, 2004). No presente estudo, utilizaremos o termo Klebsiellae para fazer referência ao grupo de espécies propostas para os gêneros *Klebsiella* e *Raoultella*.

2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE AMOSTRAS DE *Klebsiellae*

Mesmo com todo o avanço taxonômico para uma melhor compreensão dos gêneros *Klebsiella* e *Raoultella*, a identificação de amostras pertencentes a esses gêneros é complexa em função do compartilhamento de um perfil bioquímico semelhante por várias espécies. Assim sendo, esta identificação não é realizada rotineiramente nos laboratórios de microbiologia clínica, visto que os métodos convencionais geralmente fracassam no estabelecimento de diferenças entre *R. planticola* e *R. terrigena* (Monnet & Freney, 1994).

Amostras de *Klebsiellae* indol-negativas são frequentemente classificadas como *K. pneumoniae* e amostras indol-positivas como *K. oxytoca* (Liu, Mee & Mulgrave, 1997). Entretanto, além de *K. pneumoniae*, também podem mostrar uma reação de indol negativa as espécies *K. variicola*, *R. planticola* e *R. terrigena* (Brisse & Duijkeren, 2005; Monnet *et al.*, 1991; Podschun & Ullmann, 1992; Rosenblueth *et al.*, 2004; Westbrook *et al.*, 2000). Por outro lado, de forma semelhante a *K. oxytoca*, amostras da espécie *R. planticola* também podem revelar reação positiva para o indol (Podschun & Ullmann, 1992; Westbrook *et al.*, 2000). Estes estudos mostraram, portanto, que uma proporção de amostras classificadas como *K. pneumoniae* poderia ser na realidade *R. planticola* (Monnet *et al.*, 1991; Westbrook *et al.*, 2000), *R. terrigena* (Monnet *et al.*, 1991; Podschun & Ullmann, 1992) ou *K. variicola* (Brisse & Duijkeren, 2005; Rosenblueth *et al.*, 2004) e que algumas amostras classificadas como *K. oxytoca* poderiam ser *R. planticola* (Monnet *et al.*, 1991; Westbrook *et al.*, 2000). Mesmo assim, somente amostras de *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae* e *K. oxytoca* são relatadas com alguma frequência a partir de espécimes clínicos; *K. pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis*, *K. pneumoniae* subespécie *ozaenae* e *R. ornithinolytica* raramente são encontradas (Monnet *et al.*, 1991). Além disto,

amostras clínicas de *Enterobacter aerogenes* podem ser identificadas, erroneamente, como *K. pneumoniae* ou *R. terrigena* em virtude de resultados negativos para os testes de descarboxilação de ornitina e motilidade, ou da demora na positividade dos mesmos (Claeys *et al.*, 2004).

A maioria dos sistemas miniaturizados e dos métodos automatizados ainda não incluiu a identificação das espécies mais novas do grupo Klebsiellae em seus bancos de dados, pois os substratos que permitiriam sua diferenciação também não foram incluídos nos painéis de testes (Westbrook *et al.*, 2000).

Na tentativa de permitir a identificação correta de espécies do grupo Klebsiellae, alguns pesquisadores recomendaram a realização de testes adicionais (Monnet & Freney, 1994; Drancourt *et al.*, 2001), mas sem a proposição de um painel mínimo padronizado para a identificação, entre amostras de bacilos Gram-negativos fermentadores, de todas as espécies e subespécies dos gêneros *Klebsiella* e *Raoultella*.

Em 1994, Monnet & Freney propuseram a combinação de dois testes convencionais (produção de indol e descarboxilação da ornitina) e quatro testes suplementares de assimilação de substrato de carbono (etanolamina, histamina, D-melezitose e DL-3-hidroxi-butirato), adicionados a sistemas convencionais de identificação, para caracterização fenotípica de amostras de Klebsiellae. Todas as 39 amostras de *Raoultella* avaliadas neste estudo, incluindo sete amostras-padrão, mostraram-se positivas para histamina e DL-3-hidroxi-butirato e negativas para etanolamina e D-melezitose, com exceção de *R. terrigena*, que revelou teste positivo para esse último carboidrato. Por outro lado, todas as 109 amostras de *K. pneumoniae* avaliadas revelaram-se negativas para histamina. Com base nos resultados obtidos, estes autores recomendaram que o esquema proposto fosse empregado para detectar *R. planticola* e *R. terrigena* entre amostras previamente identificadas na rotina

laboratorial como *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* ou como uma *Klebsiella* spp. Monnet & Freney (1994) preconizaram, ainda, que este método fosse usado em uma etapa preliminar de estudos epidemiológicos de amostras clínicas de *Klebsiella*. As limitações deste esquema residem no fato de que os autores utilizaram cinco diferentes combinações do sistema *Analytical Profile Index* (API) [API 20E (enterobactérias), API 20EC (*Escherichia coli* e coliformes), API 50CH (carboidratos), API 50AO (ácidos orgânicos) e API 50AA (aminoácidos)] e testes de crescimento a 4° e 44°C para identificação preliminar das amostras, o que seria inviável na rotina de um laboratório de microbiologia clínica. Além disto, visto que as amostras de *Raoultella* avaliadas, incluindo sete amostras-padrão, revelaram o mesmo perfil nos testes de assimilação (positivas para histamina e DL-3-hidroxi-butirato e negativas para etanolamina e D-melezitose), seria possível reduzi-los para dois testes (histamina e D-melezitose). A não-utilização da etanolamina, por exemplo, pôde ser posteriormente observada no painel de identificação proposto por Hansen e colaboradores, em 2004.

Outro teste importante foi proposto por Drancourt e colaboradores (2001): a habilidade de crescimento a 10°C, que seria uma característica do gênero *Raoultella*, enquanto que todas as espécies de *Klebsiella*, com a exceção de *K. oxytoca*, não cresceriam sob essa temperatura.

Em virtude da descrição de *K. variicola*, Rosenblueth e colaboradores (2004) recomendaram o teste de fermentação de adonitol para diferenciação entre essa espécie e *K. pneumoniae*. O adonitol é fermentado por *Klebsiellae* e a inabilidade para fermentar esse carboidrato seria uma característica da nova espécie descrita. Para esta proposta, Rosenblueth e colaboradores (2004) estudaram 131 amostras de *Klebsiellae*, dentre as quais sete (5% do total de amostras estudado) não fermentavam adonitol. Dentre estas sete

amostras, cinco foram identificadas como *K. variicola* (KpIII), porém duas poderiam pertencer ao grupo II de *K. pneumoniae* (KpII) descrito por Brisse & Verhoef (2001). Esta observação impede a utilização deste método de forma isolada para estabelecer a identificação de *K. variicola*. Portanto, até os dias atuais, não é possível separar com segurança amostras da espécie *K. variicola* a partir de uma coleção suposta de *K. pneumoniae* utilizando-se apenas testes fenotípicos.

A espécie *K. singaporensis* foi descrita por Li e colaboradores (2004) ao estudarem uma amostra isolada a partir do solo. Esta amostra foi definida como a cepa-padrão LX3^T com as seguintes características diferenciais: produção de indol negativa, capacidade de crescimento a 10°C, teste de Voges-Proskauer positivo e fermentação de L-sorbose negativa. Até o presente, não foi relatado nenhum isolamento desta espécie em amostra de origem clínica.

Desta forma, a presença de variações nos testes fenotípicos também dificulta o processo de identificação das amostras do grupo Klebsiellae. Em novembro de 2003, demonstramos a limitação de um sistema automatizado na identificação de amostras de *K. pneumoniae* urease negativa (Alves *et al.*, 2003). Neste estudo, foram investigadas 34 amostras identificadas como *R. terrigena* pelo sistema Vitek (BioMérieux) no laboratório de origem, isoladas de espécimes clínicos diversos obtidos de pacientes admitidos no Instituto Nacional do Câncer no período de setembro do ano de 2000 a março de 2002. Todas as amostras foram reavaliadas através de testes fenotípicos convencionais, além do teste adicional de crescimento a 10°C. Três destas amostras foram submetidas ao seqüenciamento do gene *rpoB*, realizado na *DNA Sequencing Facility, University of California*, Berkeley. As seqüências obtidas foram comparadas a outras depositadas no *GenBank* utilizando o programa BLAST. Todas as amostras revelaram incapacidade de

crescimento a 10°C e de promover a hidrólise da uréia. A seqüência do gene *rpoB* revelou 100% de similaridade com a cepa *K. pneumoniae* ATCC 13883 (número de acesso U77444). Neste estudo foi possível evidenciar a importância do teste de crescimento a 10°C na diferenciação de amostras dos gêneros *Klebsiella* e *Raoultella*.

Em agosto de 2004, Hansen e colaboradores propuseram um painel composto por 18 testes bioquímicos, incluindo crescimento a 10°C e assimilação de histamina, D-melezitose e *m*-hidroxi-benzoato, para caracterizar microrganismos preliminarmente identificados como pertencentes ao gênero *Klebsiella* através de métodos convencionais ou de sistemas automatizados. Contudo, estes autores não previram a realização do teste de adonitol, descrito como necessário para a caracterização fenotípica de amostras de *K. variicola* (Rosenblueth *et al.*, 2004). Além disto, Hansen e colaboradores (2004) não empregaram nenhum método taxonômico de referência para validação do painel proposto.

A busca da correta caracterização fenotípica de amostras relacionadas aos gêneros *Klebsiella* e *Raoultella*, portanto, corresponde a um importante tópico atual de pesquisa científica.

3. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E PRODUÇÃO DE β -LACTAMASES

Amostras bacterianas relacionadas aos gêneros *Klebsiella* e *Raoultella* são encontradas no ambiente (água, esgoto, solo e plantas) e em superfícies mucosas de humanos e animais (Podschn & Ullmann, 1998), com exceção de *K. granulomatis*, cujo *habitat* natural ainda permanece desconhecido (Carter *et al.*, 1999). Contudo, estes microrganismos podem causar desde quadros de pneumonia adquirida na comunidade até

infecções nosocomiais (Podschun & Ullmann, 1998).

Dentre as amostras de origem clínica, *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae* são consideradas aquelas de maior poder patogênico dentro do gênero *Klebsiella* (Medeiros, 1997; Podschun & Ullmann, 1998). Apesar disto, outras espécies têm sido motivo de investigação em virtude da descrição de amostras de *R. planticola* e de *R. terrigena* a partir de espécimes clínicos humanos (Mori *et al.*, 1989; Podschun & Ullmann, 1992; Podschun *et al.*, 1998; Westbrook *et al.*, 2000). As amostras da espécie *K. variicola* recentemente descrita foram obtidas a partir de plantas, tais como banana, arroz, cana-de-açúcar e milho, bem como de espécimes clínicos humanos e veterinários (Rosenblueth *et al.*, 2004; Brisse & Duijkeren, 2005). Considerando-se as cinco amostras clínicas de *K. variicola* relatadas, quatro foram isoladas de sangue e uma de cateter, todas procedentes de pacientes atendidos em hospitais infantis (Rosenblueth *et al.*, 2004).

Amostras relacionadas ao gênero *Klebsiella* apresentam considerável resistência intrínseca aos antimicrobianos (Arakawa *et al.*, 1986; Fournier *et al.*, 1996; Granier *et al.*, 2003). Felizmente, um grande avanço na terapêutica das infecções causadas por estes microrganismos ocorreu com o desenvolvimento das cefalosporinas e outros β -lactâmicos de amplo espectro de ação. Entretanto, a utilização em grande escala, freqüentemente abusiva destes medicamentos (Vidotti, 2000), tem ocasionado o desenvolvimento e a disseminação acelerada de resistência adquirida (Medeiros, 1997).

Dentre as bactérias Gram-negativas, o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos é a produção de β -lactamases. Microrganismos de vários gêneros de Gram-negativos revelam produção de β -lactamases no cromossomo, freqüentemente em pequenas quantidades. Entretanto, β -lactamases plasmidiais, com ação sobre as primeiras cefalosporinas desenvolvidas, já haviam sido descritas mesmo antes do uso da penicilina na

prática médica, em amostras de *Escherichia coli* (Abraham & Chain, 1988).

Com o uso intenso de antimicrobianos, as β -lactamases clássicas, denominadas de TEM-1, TEM-2 e SHV-1, passaram a ser observadas em diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae*, incluindo o gênero *Klebsiella*, e também em outros microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (Bradford, 2001). Em resposta à grande disseminação destas β -lactamases, foram desenvolvidos novos β -lactâmicos, como as cefalosporinas de terceira geração (cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima, entre outras), o aztreonam e as associações dos β -lactâmicos de espectro mais restrito com inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (Medeiros, 1997).

No começo da década de 1980, um novo perfil de atuação de β -lactamases plasmidiais foi observado em amostras de *Enterobacteriaceae*, incluindo atuação em todos os novos β -lactâmicos desenvolvidos, com exceção apenas dos carbapenêmicos e das cefamicinas: as β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (Bush, Jacoby & Medeiros, 1995). Desde então, enterobactérias produtoras de ESBL têm sido descritas em vários países (Bradford, 2001), inclusive no Brasil (Bonnet *et al.*, 2000^a; Bonnet *et al.*, 2000^b; Sader, 2000; Behar *et al.*, 2001; Bonnet *et al.*, 2001; Martins, 2001; Oliveira, Fernandes & Almeida, 2001; Pessoa-Silva *et al.*, 2002).

Amostras bacterianas produtoras de ESBL têm sido isoladas em hospitais, especialmente em unidades de terapia intensiva, onde se observa maior risco de sua aquisição em virtude da realização de procedimentos invasivos e longos períodos de internação (Podschun & Ullmann, 1998). Amostras de *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae* têm sido as mais freqüentemente relacionadas à produção de ESBL, tornando-se endêmicas em diversos hospitais (Medeiros, 1997).

Entre 1997 e 2002, amostras de *Klebsiellae* foram responsáveis por 7-10% de todas as infecções hospitalares associadas às infecções sistêmicas na Europa, América Latina e América do Norte, como relatado pelo programa de vigilância SENTRY (Biedenbach, Moet & Jones, 2004). Na América Latina, *K. pneumoniae* está em terceiro lugar em frequência entre as bactérias Gram-negativas responsáveis pelas infecções hospitalares, sendo superada apenas por *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Sader *et al.*, 2004). No Brasil, amostras de *K. pneumoniae* produtora de ESBL (KpESBL) e de *E. coli* produtora de ESBL estão entre os microrganismos Gram-negativos multirresistentes mais frequentemente associados às infecções hospitalares (Sader, 2000). Dentre pacientes adultos admitidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, KpESBL representou a principal causa, entre os bastonetes Gram-negativos, de bacteremias hospitalares no período de fevereiro de 2000 a abril de 2001, seguida por amostras de *E. coli* e *P. aeruginosa* (Ribas *et al.*, 2001). Investigação semelhante realizada na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital Maternidade Alexander Fleming II no Rio de Janeiro revelou resultados similares (Loureiro *et al.*, 2001).

Estudos localizados tornam-se cada vez mais necessários visto que a prevalência de ESBL em amostras de origem clínica varia entre países e instituições (Bradford, 2001). Infecções por KpESBL podem ocorrer de forma endêmica ou em surtos, onde a disseminação de uma única cepa ou de mais de uma cepa é registrada (Decré *et al.*, 1998).

Outro aspecto a ser considerado é que, em virtude da elevada prevalência da produção de ESBL em amostras nosocomiais, a pressão seletiva imposta pelo uso frequente de carbapenêmicos tem levado a altos níveis de resistência a essas drogas entre amostras de bastonetes Gram-negativos, inclusive *Klebsiella*, com o aparecimento de amostras multirresistentes produtoras de metalo- β -lactamases, enzimas pertencentes à classe B de

Ambler e que constituem um grupo de elevada importância devido à hidrólise sistemática de carbapenênicos (Livermore & Woodford, 2000) como recentemente relatado no Brasil (Lincopan *et al.*, 2005) e Portugal (Conceição *et al.*, 2005).

Semelhantes a *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, amostras de *K. variicola* são susceptíveis ao ácido nalidíxico, mas naturalmente resistentes à ampicilina e à carbenicilina, sendo susceptíveis a essas drogas apenas na presença do ácido clavulânico. Muitas destas amostras são susceptíveis à gentamicina e à espectinomicina (Rosenblueth *et al.*, 2004). Entretanto, até o presente momento não há relato de amostras de *K. variicola* produtoras de ESBL (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>, acessado em fevereiro de 2006).

Amostras do gênero *Raoultella* apresentam padrão de resistência aos β -lactâmicos idêntico àquele descrito para amostras clínicas de *Klebsiella*, sendo resistentes às amino e carboxi-penicilinas, mas sensíveis a essas drogas quando combinadas ao ácido clavulânico. Este fenótipo de resistência sugere que espécies deste novo gênero produzem β -lactamases de classe A tipicamente cromossômica tal como as espécies de *Klebsiella*, embora discretas diferenças na susceptibilidade natural aos β -lactâmicos indiquem a presença de β -lactamases distintas (Stock & Wiedemann, 2001). Em 2003, Granier e colaboradores demonstraram que as supostas β -lactamases observadas para as três espécies de *Raoultella* eram incapazes de ser amplificadas pelos iniciadores usados para amplificar os genes cromossômicos *bla*_{OXY-1} e *bla*_{OXY-2} que codificam β -lactamases de *K. oxytoca*, descritos por Fournier e colaboradores, em 1996. Posteriormente, Walckenaer e colaboradores (2004) clonaram e caracterizaram genes *bla* de *R. planticola* ATCC 33531 e *R. ornithinolytica* ATCC 31898. Segundo estes autores, os genes codificavam uma β -lactamase de classe A denominada PLA-1 e ORN-1, nas amostras de *R. planticola* e *R. ornithinolytica*,

respectivamente.

4. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE AMOSTRAS DE *Klebsiellae*

Para o controle da disseminação de patógenos resistentes, o conhecimento sobre o comportamento epidemiológico dos diferentes microrganismos importantes na microbiologia humana é fundamental, permitindo o desenho e a implementação de medidas preventivas efetivas.

A tipagem de cepas bacterianas, aliada aos estudos de epidemiologia clássica, tem sido de suma importância para a melhor compreensão da epidemiologia das infecções hospitalares (Tenover, Arbeit & Goering, 1997). Através de estudos da epidemiologia molecular pode-se estabelecer o grau de similaridade entre as amostras bacterianas envolvidas nestas infecções, o que permite a formulação de hipóteses sobre seus reservatórios e mecanismos de transmissão (Monnet *et al.*, 1997; Agata *et al.*, 1998; Branger *et al.*, 1998; Gaillot *et al.*, 1998; Palucha *et al.*, 1999; Hollander *et al.*, 2001).

Assim sendo, novas técnicas de tipagem molecular tais como análise de perfil de plasmídios tratados ou não tratados com endonucleases de restrição, e técnicas baseadas em reação da polimerase em cadeia (PCR), proporcionam uma melhor compreensão do delineamento de cepas em estudos epidemiológicos e permitem a diferenciação entre infecções causadas por cepas epidêmicas únicas ou por cepas não-relacionadas (Davin-Regli *et al.*, 1996).

Uma técnica molecular adequada para a tipagem bacteriana é a avaliação dos perfis de fragmentação do DNA após tratamento com enzima de restrição e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). A técnica de PFGE está entre os procedimentos de tipagem mais

confiáveis e reprodutíveis, permitindo a detecção de um alto grau de polimorfismo de DNA (Davin-Regli *et al.*, 1996). A análise do DNA cromossômico através desta técnica é freqüentemente utilizada para estudos epidemiológicos com amostras produtoras de ESBL, apesar de ser demorada, de difícil execução e onerosa (Tenover, Arbeit & Goering, 1997).

Os métodos de tipagem baseados na amplificação de ácidos nucléicos, como PCR, são adequados para a detecção e caracterização epidemiológica de microrganismos (Gori *et al.*, 1996). A análise do polimorfismo de segmentos do DNA amplificado de forma aleatória (*Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) e o *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR* (ERIC-PCR) são variações da técnica de PCR utilizadas para este fim. O RAPD é baseado na amplificação de segmentos de DNA utilizando iniciadores com seqüências arbitrárias (Tenover, Arbeit & Goering, 1997), enquanto que o ERIC-PCR se fundamenta na amplificação de segmentos do DNA que se repetem no cromossomo de enterobactérias através do uso de iniciadores específicos (Sharples & Lloyd, 1990; Versalovic, Koeuth & Lupski, 1991).

Em alguns estudos epidemiológicos, RAPD e ERIC-PCR foram comparados a PFGE (Liu *et al.*, 1995; Pruckler *et al.*, 1995). Estes estudos demonstraram que estes métodos representam meios rápidos e simples de tipagem molecular, com um nível de discriminação que se aproxima àquele do PFGE (Liu *et al.*, 1995; Pruckler *et al.*, 1995). As técnicas de RAPD e ERIC-PCR, especialmente essa última, mostraram-se ferramentas úteis para tipagem epidemiológica de amostras de enterobactérias, incluindo *Klebsiellae* (Ben-Hamouda *et al.*, 2003; Bosi *et al.*, 1999; Cartelle *et al.*, 2004; Davin-Regli *et al.*, 1996; Decré *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 1995; Manges *et al.*, 2001; Meacham *et al.*, 2003). De acordo com Cartelle e colaboradores (2004), o ERIC-PCR parece ser o melhor método baseado em PCR para tipagem de amostras de *K. pneumoniae*.

Por outro lado, a investigação da filogenia bacteriana se desenvolveu muito através da comparação entre seqüências do RNAr 16S (Weisburg *et al.*, 1991). Entretanto, a utilização destas seqüências sofre uma limitação pela possibilidade da presença de várias cópias de genes ribossômicos no genoma bacteriano, como observado por Hill & Harnish (1981) em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* e, recentemente, em *Klebsiella variicola*, por Rosenblueth e colaboradores (2004), todas apresentando sete cópias. Dahllöf, Baillie & Kjelleberg (2000) também demonstraram que a utilização de seqüências de RNAr 16S apresentava um problema inerente à heterogeneidade entre cópias do RNAr 16S em muitas espécies. Finalmente, segundo Hashimoto, Stevenson & Schmidt (2003), apesar do RNAr 16S ser conservado, esse elemento genético está sujeito a recombinação e conversão de genes.

Mollet, Drancourt & Raoult (1997) determinaram as seqüências parciais do *rpoB* (fragmento de 512 pares de bases) e do RNAr 16S de 20 amostras de 14 espécies de *Enterobacteriaceae* e estabeleceram um banco de dados. Quando estas seqüências parciais de *rpoB* e de RNAr 16S foram comparadas, níveis de divergência claramente superiores foram observados entre as seqüências de *rpoB* das amostras. Este poder discriminatório superior do *rpoB* foi depois confirmado quando 20 amostras clínicas de *Enterobacteriaceae* foram selecionadas para a correta identificação das espécies baseada na comparação de seqüências de *rpoB*. Esta comparação de seqüências de *rpoB* de membros da família *Enterobacteriaceae* também foi usada como base para análises filogenéticas. As árvores obtidas com o *rpoB* foram mais compatíveis com a classificação mais aceita de *Enterobacteriaceae* do que as obtidas com o RNAr 16S.

O seqüenciamento do gene *rpoB* tem sido usado, portanto, como uma ferramenta para a identificação bacteriana assim como para análise filogenética (Mollet, Drancourt &

Raoult, 1997). Além disto, o *rpoB* é um gene essencial (*housekeeping gene*) conservado, e pelo menos uma cópia está presente em todas as bactérias por causa de seu papel no metabolismo celular (Qi *et al.*, 2001). Devido ao poder discriminatório da análise de *rpoB*, esse gene tem sido usado para o desenvolvimento de sondas para a detecção específica e análise filogenética de vários grupos bacterianos (Mollet, Drancourt & Raoult, 1997; Qi *et al.*, 2001; Tayeb *et al.*, 2005).

5. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista as intensas mudanças na taxonomia do gênero *Klebsiella* e semelhantes, e a importância desse grupo de microrganismos em infecções que acometem seres humanos, desenhamos o presente estudo, na busca de uma proposta simples para sua identificação. Como ferramenta de estudo, realizamos a caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Klebsiellae* isoladas de pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (HU/UFJF) no período de março de 2002 a março de 2004.

O HU/UFJF é um hospital público, terciário, considerado de referência no atendimento clínico-laboratorial de pacientes do município de Juiz de Fora, MG, cidade com uma população estimada de 501.153 habitantes em 01 de julho de 2005 (<http://www.ibge.com.br/cidadesat>, acessado em fevereiro de 2006), e dos demais municípios da zona da mata mineira e campo das vertentes, região sudeste do estado de Minas Gerais, incluindo 174 cidades e uma população residente de 2.542.427 em 2000 (<http://www.sidra.ibge.gov.br>, acessado em fevereiro de 2006).

Em março de 2002, o HU/UFJF contava com 131 leitos ativos: 50 de clínica médica; 45 de clínicas cirúrgica e ginecológica; 15 de clínica pediátrica; 06 de unidade terapia intensiva (UTI) e 15 de hospital-dia (10 para atendimento geral e 05 para pacientes portadores de AIDS). A média mensal de atendimentos no ano de 2001 foi de 9.305 consultas sendo 8.155 especializadas e 1.150 de urgência ou emergência. O Laboratório Maurílio Baldi foi responsável pela execução de 22.515 exames complementares por mês para os pacientes atendidos nos ambulatórios ou internados no HU/UFJF.

Desde 2004, o Setor de Microbiologia do Laboratório Maurílio Baldi – HU/UFJF vem implantando, em conjunto com a equipe do Núcleo de Informática do Centro Regional de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFJF, um sistema informatizado no intuito de melhor documentar os resultados de identificação e avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras isoladas nesse local. Entretanto, o comportamento epidemiológico de amostras relacionadas a qualquer patógeno, inclusive *Klebsiellae*, ainda é pouco conhecido em função da escassez de dados locais, o que compromete a estimativa da existência de amostras bacterianas multirresistentes e a elaboração de recomendações para a adequada prescrição de antimicrobianos. Além disto, de acordo com Brisse & Verhoef (2001), a caracterização fenotípica e molecular de um grupo adicional de amostras com identificação inicial de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, por exemplo, procedentes de países distintos dos europeus, bem como de outros ambientes ecológicos, é desejável, podendo conduzir à identificação de agrupamentos genéticos adicionais.

Desta forma, o presente estudo foi desenhado para contribuir para a compreensão da taxonomia e epidemiologia molecular de *Klebsiellae* através da análise de uma coleção recente de amostras relacionadas a esse grupo.

OBJETIVOS

O presente estudo foi planejado com o objetivo geral de se descrever a caracterização fenotípica e molecular de um grupo de amostras de *Klebsiellae* isoladas no HU/UFJF, no período de março de 2002 a março de 2004. Os objetivos específicos foram:

1. Proceder à identificação em espécies das amostras de *Klebsiellae*, através de testes fenotípicos e da análise das seqüências do gene *rpoB*;
2. Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e a taxa de produção de β -lactamases de espectro estendido dentre estas amostras;
3. Avaliar a diversidade genômica entre as amostras através do emprego da técnica de *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR* (ERIC-PCR).

MATERIAL E MÉTODOS

1. DESENHO DO ESTUDO

No presente estudo foram avaliadas amostras de *Klebsiellae* isoladas de 120 pacientes atendidos no HU/UFJF (62 ambulatoriais e 58 internados). As amostras de *Klebsiellae* foram identificadas em espécies e avaliadas quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos e à produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL). A identificação genotípica foi feita pelo seqüenciamento do gene *rpoB*. A diversidade genômica entre as amostras de *Klebsiellae* foi determinada através do emprego da técnica de ERIC-PCR. A caracterização de *K. granulomatis* não foi realizada no presente estudo.

2. PERÍODO DO ESTUDO

A coleta de amostras foi efetuada no período de março de 2002 a março de 2004.

3. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HU/UFJF. O estudo foi observacional, não tendo sido efetuada coleta adicional de exames, além dos previstos pela rotina assistencial do hospital.

4. AMOSTRAS AVALIADAS

No presente estudo foi incluído um total de 122 amostras de *Klebsiellae* obtidas, consecutivamente, de qualquer espécime clínico de 120 pacientes atendidos no HU/UFJF, recebidos no Setor de Microbiologia do Laboratório Maurílio Baldi – HU/UFJF. A inclusão foi de apenas uma única amostra bacteriana por paciente, exceto para dois pacientes os quais tinham uma amostra de *K. pneumoniae* e uma de *K. oxytoca* cada. Nos casos em que houve mais de uma amostra da mesma espécie, foi dada preferência àquela de sítio normalmente estéril e à amostra bacteriana resistente. Além disto, somente para a análise da sequência do gene *rpoB*, foram incluídas as duas amostras classificadas como *R. planticola* obtidas de um mesmo paciente. Os dados referentes ao número do prontuário, procedência e data de isolamento foram anotados em ficha própria. Quaisquer outras informações que se fizeram necessárias foram obtidas a partir do prontuário do paciente.

5. AMOSTRAS-CONTROLE

Para o controle de qualidade dos testes realizados no presente estudo foram utilizadas amostras apropriadas da *American Type Culture Collection* (ATCC) ou previamente caracterizadas no Laboratório de Epidemiologia Molecular de Infecções Bacterianas do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (LEMIB/IMPPG). As amostras de referência incluíram *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *R. planticola* ATCC 33531 e *R. terrigena* ATCC 33257. As amostras *Enterobacter aerogenes* Fer004, *Morganella morganii* Fer228 e *Proteus mirabilis* Fer010

pertencem à coleção de culturas do laboratório LEMIB/IMPPG.

6. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS AMOSTRAS DE *Klebsiellae*

Todas as amostras isoladas e previamente identificadas como *Klebsiellae* de acordo com os procedimentos microbiológicos rotineiros não-automatizados adotados no Setor de Microbiologia do Laboratório Maurílio Baldi – HU/UFJF, incluídas no presente estudo, foram armazenadas e posteriormente reavaliadas através de 16 testes fenotípicos convencionais para *Enterobacteriaceae* conforme esquema proposto por Farmer III e colaboradores (1985), e de quatro testes adicionais selecionados a partir daqueles recomendados por Drancourt e colaboradores (2001) e Monnet & Freney (1994).

Os testes iniciais seguiram os protocolos sugeridos por MacFaddin (1976), com exceção do teste de fermentação do adonitol cujo protocolo seguiu as recomendações de Fischer e colaboradores (1989), e incluíram teste de oxidase; fermentação de glicose e lactose ou sacarose, produção de gás e H₂S em meio ágar tríplice açúcar-ferro (TSI); motilidade e produção de indol em meio ágar sulfeto-indol-motilidade (SIM) e teste da gota pendente, quando necessário; utilização de citrato e malonato; descarboxilação de arginina, lisina e ornitina; desaminação de fenilalanina; produção de urease e testes de vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP). Excepcionalmente para a amostra K124 que apresentou um perfil sugestivo de *K. oxytoca* e que se mostrou repetidamente indol-negativa no meio SIM, a produção de indol foi avaliada pelo gotejamento de cinco gotas do reativo de Kovac sobre colônias crescidas em Fluorocult[®] ECD-Ágar (Diagnostica Merck, Darmstadt, Alemanha) após um período de incubação de 18-24 horas, em aerobiose.

Os testes adicionais incluíram o crescimento a 10°C e fermentação de L-sorbose

(Edwards & Ewing, 1986) e assimilação de histamina e D-melezitose (Monnet & Freney, 1994).

O armazenamento das amostras foi feito através da manutenção das mesmas como suspensões densas em solução contendo leite desnatado (Molico – Nestlé, Araçatuba, SP, Brasil) a 10% (p/v) acrescido de glicerol (Vetec Química e Representações Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 10% (v/v) (solução LDG). Para cada amostra foi preparada uma suspensão densa (obtida a partir de crescimento de 24 horas) diretamente em 1,0 mL de solução LDG distribuída previamente em tubos plásticos com tampa de rosca próprios para congelamento (Inlab, São Paulo, SP, Brasil). A seguir, estes tubos foram armazenados em uma temperatura de cerca de 20°C negativos.

Para a preparação do inóculo a ser utilizado nos testes de identificação, as amostras foram semeadas em placas de Petri contendo ágar MacConkey (Diagnostica Merck, Darmstadt, Alemanha) através da técnica de esgotamento em superfície. Procedida à semeadura, estas culturas foram incubadas a 35°-37°C, em aerobiose, por 16-24 horas.

6.1 Inclusão de amostras de Klebsiellae nos gêneros *Klebsiella* e *Raoultella*

As amostras foram incluídas no gênero *Klebsiella* quando apresentaram o seguinte perfil: bastonetes Gram-negativos, isolados, aos pares ou em cadeias curtas; imóveis; que formam colônias de aspecto mucóide que, em ágar MacConkey, adquirem coloração rósea indicando fermentação de lactose e produção de ácido; oxidase negativas; fermentadoras de glicose, sendo que a maioria das amostras é capaz de produzir o butilenoglicol como produto final dessa fermentação (reação de Voges-Proskauer positiva) podendo ou não formar gás; incapazes de produzir ácido sulfídrico (H₂S) e variáveis quanto à produção de

indol, mas capazes de promover hidrólise da uréia e de utilizar o citrato como única fonte de carbono. Quanto à descarboxilação de aminoácidos, geralmente apresentam reação positiva para lisina e negativa para arginina e ornitina; quanto à desaminação, revelam reação negativa para fenilalanina (Holmes & Aucken, 1998; Abbott, 1999; Drancourt *et al.*, 2001; Winn Jr. *et al.*, 2006). Apresentam inabilidade de assimilação de histamina e capacidade variável quanto à utilização de D-melezitose (Monnet & Freney, 1994). Não revelam crescimento a 10°C e não utilizam L-sorbose como única fonte de carbono (Drancourt *et al.*, 2001).

Para a inclusão das amostras no gênero *Raoultella* foram observadas as características descritas acima, porém, com teste de assimilação positivo para histamina (Monnet & Freney, 1994) e com presença de crescimento a 10°C e utilização da L-sorbose como única fonte de carbono (Drancourt *et al.*, 2001).

6.1.1. Observação das características morfológicas das colônias em Ágar MacConkey

As amostras foram semeadas pela técnica de esgotamento em superfície em placas contendo ágar MacConkey (Diagnostica Merck, Darmstadt, Alemanha) preparado conforme as instruções do fabricante e incubadas a 35°-37°C, em aerobiose, por 16-24 horas para posterior observação das características morfotintoriais das células bacterianas e a morfologia colonial.

6.1.2. Observação das características morfotintoriais das amostras

As características morfotintoriais das células bacterianas foram observadas através

de preparações fixadas, tratadas pela coloração de Gram e examinadas ao microscópio óptico comum.

6.1.3. Teste da oxidase

Para a verificação da produção da enzima citocromo-oxidase, uma colônia bacteriana da amostra em teste foi depositada sobre uma tira de papel de filtro impregnada com o reativo de dicloridrato de tetrametil- ρ -fenilenodiamina a 1% (p/v) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), com auxílio de um palito de madeira ou de uma alça de inoculação descartável. O surgimento de uma coloração azul-escura no local de deposição, em 10 segundos, foi considerado indicativo de teste positivo (MacFaddin, 1976). Como controles positivo e negativo foram utilizadas, respectivamente, as amostras *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Proteus mirabilis* Fer010.

6.1.4. Teste de fermentação de carboidratos (glicose e lactose ou sacarose) e produção de gás e H₂S em meio TSI

O TSI (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), preparado em tubo de ensaio 13 X 100 mm conforme as instruções do fabricante, foi inoculado com a amostra em teste através de uma picada central e estria na superfície inclinada. Após incubação a 35°-37°C, em aerobiose, por 18-24 horas, foi observada a produção de H₂S pela formação de precipitado negro e a fermentação de glicose pela viragem do indicador revelando uma coloração amarelada na base do tubo. O surgimento desta coloração na parte superior, próxima à superfície, indicou a fermentação da lactose e/ou sacarose. A produção de gás foi detectada

pela presença de bolhas ou rachaduras no meio (MacFaddin, 1976). A amostra *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade positivo para a fermentação de lactose e/ou sacarose e produção de gás e negativo para a produção de H₂S. A amostra *P. mirabilis* Fer010 foi empregada como controle negativo para a fermentação de lactose e/ou sacarose e produção de gás e positivo para a produção de H₂S.

6.1.5. Teste de motilidade e produção de indol em meio SIM

A motilidade foi avaliada no meio SIM (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) preparado em tubo de ensaio de 13 x 100 mm conforme as instruções do fabricante. Após semeadura da amostra em teste através de uma picada central até um centímetro abaixo da superfície do meio com auxílio de uma agulha microbiológica e incubação por 18-24 horas, a 35°-37°C, em aerobiose, a motilidade foi interpretada através de inspeção visual da turvação do meio de cultura. A detecção de uma zona difusa de crescimento projetada a partir da linha de inoculação revelou motilidade positiva. Os microrganismos que se mostraram imóveis por este método foram submetidos à reavaliação através da técnica da gota pendente para confirmação da imobilidade (MacFaddin, 1976). A amostra *E. aerogenes* Fer004 foi utilizada como controle positivo e a amostra *K. pneumoniae* ATCC 13883 como controle negativo.

A formação de indol resultante da degradação do triptofano pela ação da enzima triptofanase foi avaliada no meio SIM (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), preparado em tubo de ensaio de 13 x 100 mm conforme as instruções do fabricante. Após semeadura da amostra em teste através de uma picada central até um centímetro abaixo da superfície do meio e incubação por 18-24 horas, a 35°-37°C, em aerobiose, foram adicionadas cinco

gotas do reativo de Kovacs (10 g de p -dimetilaminobenzaldeído dissolvidos em 150 mL de álcool isoamílico posteriormente acrescidos de 50 mL de ácido clorídrico concentrado), deixando-as escorrer pela parede interna do tubo. O aparecimento de coloração avermelhada na interface do reativo e do meio indicou um teste positivo (MacFaddin, 1976). Foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente, as amostras *E. coli* ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC 13883.

6.1.6. Vias de metabolismo da glicose – Vermelho de Metila e reação de Voges-Proskauer

Uma alíquota de 3 mL de caldo Vermelho de Metila/Voges-Proskauer (VM/VP) (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) preparado conforme as instruções do fabricante e distribuído em tubo de ensaio de 13 x 100 mm, em duplicata, foi inoculada com a amostra em teste. Após incubação por 48-72 horas, a 35°-37°C, em aerobiose, foram realizados os testes VM e VP. Para a execução do teste VP, uma alíquota do caldo foi acrescida do reativo de Barritt (A): 0,6 mL de α -naftol a 5% (p/v) em álcool etílico absoluto e (B): 0,2 mL de hidróxido de potássio a 40% (p/v) e, em seguida, agitada suavemente por 30 segundos. A formação de coloração avermelhada estável na superfície do tubo foi interpretada como reação positiva. Para a realização do teste VM, na outra alíquota do meio foram adicionadas 5 gotas do reativo de vermelho de metila (0,1 g de vermelho de metila dissolvidos em 300 mL de álcool etílico a 95% e posterior adição de 200 mL de água destilada) e a reação foi lida imediatamente. O desenvolvimento de uma cor vermelha foi indicativo da positividade do teste (MacFaddin, 1976). Como controle de qualidade foram utilizadas as amostras *E. coli* ATCC 25922 e *Enterobacter aerogenes* Fer004 como

controles positivo e negativo, respectivamente, para o teste do VM e o resultado inverso para o teste do VP.

6.1.7. Utilização de citrato em Ágar Citrato de Simmons

A amostra em teste foi inoculada, através de estria única, em tubo de ensaio de 13 x 100 mm contendo ágar citrato de Simmons inclinado (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) preparado conforme as instruções do fabricante. Após incubação por 24-48 horas, a 35°-37°C, em aerobiose, a utilização de citrato como única fonte de carbono com formação de produtos alcalinos foi avaliada através da observação de crescimento bacteriano e da viragem da cor verde do meio para azul-escuro, o que indicou prova positiva (MacFaddin, 1976). Foram utilizadas as amostras *E. aerogenes* Fer004 e *E. coli* ATCC 25922 como controles positivo e negativo, respectivamente.

6.1.8. Teste da descarboxilação de aminoácidos (arginina, lisina e ornitina)

Para a observação da descarboxilação da arginina, lisina e ornitina, a amostra em teste foi inoculada em tubo de ensaio de 13 x 100 mm contendo meio base para descarboxilação de aminoácidos segundo Möeller (Vetec Química e Representações Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), preparado conforme as orientações do fabricante e acrescido de L-arginina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) ou L-lisina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) ou L-ornitina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Um outro tubo contendo meio base para descarboxilação de aminoácidos segundo Möeller, desprovido de aminoácido, foi utilizado como controle do meio. Após a inoculação, os

meios foram recobertos com uma camada de óleo mineral estéril. Foi considerado positivo o teste que apresentou mudança de coloração de amarelo para púrpura após um período de incubação de 24-48 horas, a 35°-37°C, em aerobiose (MacFaddin, 1976). Como controle de qualidade da descarboxilação da lisina foram utilizadas as amostras *K. pneumoniae* ATCC 13883 e *E. aerogenes* Fer004 como controles positivo e negativo, respectivamente; o resultado inverso foi empregado para o controle do teste de descarboxilação da arginina e da ornitina.

6.1.9. Teste de desaminação da fenilalanina

Para a observação da desaminação da fenilalanina com conseqüente produção de ácido fenilpirúvico, a amostra em teste foi inoculada em tubo de ensaio de 13 x 100 mm contendo meio de fenilalanina ágar (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) preparado conforme as instruções do fabricante. Após incubação por 18-24 horas, a 35°-37°C, em aerobiose, foram adicionadas 4-5 gotas de uma solução de cloreto férrico a 10% (p/v) na superfície do meio. O aparecimento de uma coloração esverdeada dentro de 1-5 minutos foi considerado teste positivo (MacFaddin, 1976). Foram utilizadas as amostras *P. mirabilis* Fer010 e *E. coli* ATCC 25922 como controles positivo e negativo, respectivamente.

6.1.10. Produção de urease em Ágar Uréia de Christensen

A amostra em teste foi inoculada, através de estria, em tubo de ensaio 13 X 100 mm contendo ágar uréia de Christensen (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) inclinado preparado conforme as instruções do fabricante e incubada a 35°-37°C, por 18-24 horas, em

aerobiose. Posteriormente, a observação de uma coloração rósea, em todo o meio ou apenas na área inclinada (positivo fraco), foi indicativa de que o microrganismo degradou a uréia a partir da produção de urease (MacFaddin, 1976). Foram utilizadas as amostras *P. mirabilis* Fer010, *K. pneumoniae* ATCC 13883 e *E. coli* ATCC 25922 como controles positivos, positivo fraco e negativo, respectivamente.

6.1.11. Teste de utilização do malonato

Para a determinação da habilidade de um microrganismo utilizar o malonato de sódio como única fonte de carbono com conseqüente alcalinidade, 10 µL de uma suspensão da amostra bacteriana em teste preparada de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland foram inoculados em tubo de ensaio de 13 x 100 mm contendo 3 mL de caldo malonato (Diagnostica Merck, Darmstadt, Alemanha) preparado de acordo com as instruções do fabricante. Após incubação a 35°-37°C, por até 48 horas, em aerobiose, a observação de qualquer traço de coloração azul revelou um resultado positivo e a manutenção da cor verde do meio ou o aparecimento de coloração amarela foram indicativas de resultado negativo (MacFaddin, 1976). As amostras *K. pneumoniae* ATCC 13883 e *E. coli* ATCC 25922 foram empregadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

6.1.12. Teste de fermentação do adonitol

Um volume de 10 µL de uma suspensão da amostra bacteriana em teste preparada de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland foi inoculado em tubo de ensaio 13 X 100 mm contendo 3 mL de meio base *Enteric Fermentation* (Becton Dickinson Microbiology

Systems, Cockeysville, MD, EUA) com azul de bromotimol (Vetec Química e Representações Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (0,1 g de azul de bromotimol dissolvidos em 20 mL de álcool etílico a 95% quente e posterior adição de água destilada q.s.p. 100 mL) acrescido de uma solução de adonitol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) a 1% (p/v). Após incubação a 35°-37°C, por até sete dias com leitura diária, em aerobiose, a observação de coloração amarela revelou um resultado positivo e a manutenção da cor verde do meio foi indicativa de resultado negativo (Fischer *et al.*, 1989). Foram utilizadas as amostras *K. pneumoniae* ATCC 13883 e *M. morgani* Fer228 como controles positivo e negativo, respectivamente.

6.1.13. Teste de crescimento a 10°C

Um volume de 10 µL de uma suspensão da amostra bacteriana em teste preparada de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland e mantida em banho de gelo após preparo foi inoculado em tubo de ensaio de 13 x 100 mm contendo 3 mL de *Trypticase Soy Broth* (TSB) (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) preparado conforme as instruções do fabricante. Após incubação em estufa BOD por até 72 horas, a 10°C, em aerobiose, a observação de crescimento bacteriano foi feita através de inspeção visual. Foram utilizadas as amostras *R. planticola* ATCC 33531 e *K. pneumoniae* ATCC 13883 como controles positivo e negativo, respectivamente.

6.1.14. Teste de utilização de L-sorbose

Um volume de 10 µL de uma suspensão da amostra bacteriana em teste preparada

de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland foi inoculado em tubo de ensaio 13 X 100 mm contendo 3 mL de meio base *Enteric Fermentation* (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, EUA) com indicador de Andrade acrescido de uma solução de L-sorbose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) a 0,5% (p/v) e incubada a 35°-37°C, por até 7 dias com leitura diária, em aerobiose. Foram utilizadas as amostras *R. planticola* ATCC 33531 e *K. pneumoniae* ATCC 13883 como controles positivo e negativo, respectivamente.

Apesar do método preconizado para a realização deste teste utilizar o indicador de Andrade como indicador de viragem de pH (Edwards & Ewing, 1986), testamos a solução indicadora de azul de bromotimol empregada no teste de fermentação do adonitol em substituição à recomendada e obtivemos os mesmos resultados.

6.2. Identificação das espécies de Klebsiellae

As amostras de Klebsiellae que tiveram a identificação confirmada dentro dos gêneros *Klebsiella* e *Raoultella* foram submetidas a uma caracterização complementar de espécies, conforme dados de diferenciação apresentados na Tabela 1.

Para a caracterização das espécies *R. planticola*, *R. terrigena* e *R. ornithinolytica*, as amostras foram submetidas ao teste de assimilação de carbono (histamina e D-melezitose), conforme recomendações de Monnet & Freney (1994) (Tabela 1).

6.2.1. Teste de assimilação de carbono (histamina e D-melezitose)

Foi preparada uma suspensão da amostra em teste em solução de cloreto de sódio

0,85% (p/v) estéril de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland e, após, 100 µL dessa suspensão foram inoculados em dois tubos de ensaio contendo 50 µL de uma solução de histamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) a 1% (p/v) em água destilada ou D-melezitose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) a 2% (p/v) em água destilada. Um outro tubo, desprovido de fonte de carbono, foi utilizado como controle de crescimento. Posteriormente, todos os tubos inoculados foram acrescidos de 200 µL de meio AUX (meio basal empregado para o preparo do inóculo bacteriano a ser testado no sistema API) (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França) e incubados por até 48 horas a 30°C. A presença ou ausência de crescimento bacteriano foi observada por inspeção visual e comparação com o crescimento no tubo-controle (Monnet & Freney, 1994). As amostras *R. planticola* ATCC 33531 e *K. pneumoniae* ATCC 13883 foram utilizadas como controles positivo e negativo de histamina, respectivamente. Para controle de qualidade de D-melezitose utilizou-se a amostra *R. terrigena* ATCC 33257 como controle positivo e a amostra *K. pneumoniae* ATCC 13883 como controle negativo.

Tabela 1. Testes bioquímicos utilizados na diferenciação de espécies e subespécies dos gêneros *Klebsiella* e *Raoultella*.

Prova de Identificação	Porcentagem de amostras que apresentam reação positiva nas espécies ou subespécies						
	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>R. planticola</i>	<i>R. terrigena</i>	<i>R. ornithinolytica</i>
Fermentação de Glicose com Produção de Gás*	97	50	0	97	100	80	100
Fermentação de Lactose*	98	30	0	100	100	100	100
Produção de Indol*	0	0	0	99	20	0	100
Teste de Vermelho de Metila*	10	98	100	20	100	60	96
Reação de Voges-Proskauer*	98	0	0	95	98	100	70
Descarboxilação da Ornitina*	0	3	0	0	0	20	100
Descarboxilação da Lisina*	98	40	0	99	100	100	100
Utilização de Citrato*	98	30	0	95	100	40	100
Utilização de Malonato*	93	3	95	98	100	100	100
Produção de Urease*	95	10	0	90	98	0	100
Fermentação de Adonitol*	90	97	100	99	100	100	100
Crescimento a 10°C**	0	0	0	87	97	100	96
Fermentação de L-sorbose**	75	44	30	100	100	93	100
Assimilação de Histamina***	0	0	0	0	100	100	100
Assimilação de D-Melezitose***	1	0	0	74	0	100	0

Fonte: Adaptada de Farmer III *et al.*, 1985*; Hansen *et al.*, 2004** e Monnet & Freney, 1994***

7. SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Um total de 122 amostras de *Klebsiellae* foi avaliado quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos conforme descrito a seguir.

7.1. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e triagem para a produção de ESBL

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 122 amostras de *Klebsiellae* identificadas foi avaliado pelos resultados obtidos no teste de difusão em ágar realizado conforme as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003; CLSI 2005).

Foram utilizados os seguintes discos de antimicrobianos (Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda. – CECON, São Paulo, SP, Brasil): amicacina (5µg), amoxicilina/clavulanato (30µg/10µg), ampicilina (10µg), aztreonam (30µg), cefalotina (30µg), cefepima (30µg), cefotaxima (30µg), cefoxitina (30µg), ceftazidima (30µg), ceftriaxona (30µg), ciprofloxacina (5µg), gentamicina (10µg) imipenem (10µg) e sulfametoxazol/trimetoprim (25µg).

As amostras que apresentaram halos de inibição para ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona ou aztreonam menores ou iguais a 22, 27, 25 e 27 mm, respectivamente, foram interpretadas como suspeitas de produzirem ESBL, de acordo com critérios estabelecidos (CLSI, 2005).

As amostras *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *E. coli* ATCC 25922 foram utilizadas como controle de qualidade do teste. A amostra *E. coli* ATCC 35218 foi empregada para o

controle de qualidade da combinação β -lactâmico/inibidor de β -lactamase.

Para o cálculo das porcentagens de resistência, a categoria intermediária foi analisada junto com a resistente. As amostras que apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos pertencentes a classes distintas foram consideradas multirresistentes.

7.2. Teste de disco adição com ácido clavulânico

O teste fenotípico confirmatório para detectar a produção de ESBL (CLSI, 2005) consistiu na comparação entre os halos de inibição obtidos para os discos de cefalosporinas de espectro estendido com aqueles obtidos para o β -lactâmico adicionado de inibidor de β -lactamase.

Para cada amostra avaliada foram utilizados discos individuais de ceftazidima (30 μ g) e de cefotaxima (30 μ g) isoladamente e acrescidos de 10 μ g de ácido clavulânico (gentilmente cedido por SmithKline Beecham, Essex, Inglaterra). A confirmação da produção de ESBL foi feita pela observação de um aumento no halo de inibição maior ou igual a 5 mm para o disco adicionado de ácido clavulânico.

As amostras *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *E. coli* ATCC 25922 foram utilizadas como controles de qualidade positivo e negativo, respectivamente.

8. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DAS AMOSTRAS DE *Klebsiellae*

Amostras representativas de cada espécie incluída no estudo foram submetidas à análise das seqüências do gene *rpoB*, conforme descrito por Drancourt e colaboradores (2001). Esta etapa do estudo foi desenvolvida na University of California, Berkeley,

Califórnia, EUA e contou com a colaboração do Prof. Lee W. Riley.

8.1. Extração de DNA

O DNA foi extraído por lise térmica. A amostra bacteriana em teste foi inoculada através da técnica de esgotamento em placa de Petri contendo ágar Luria Bertani (LB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e posteriormente incubada a 37°C, por 12-24 horas, em aerobiose. A partir deste crescimento bacteriano, cinco colônias foram repicadas para tubo de ensaio contendo 3mL de caldo LB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e procedeu-se a nova incubação a 37°C, por 12-24 horas, em aerobiose. Um volume de 1 mL deste novo crescimento em caldo foi transferido para *eppendorf* com capacidade 1,5-2,0 mL e, após esta transferência, foi centrifugado a 30.000 g por 2 minutos. Com auxílio de bomba de vácuo, desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi armazenado a 80°C negativos. Para a extração de DNA, o sedimento armazenado foi ressuspensão com 100 µL de água purificada (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e submetido à ebulição por 10 minutos. Após a fervura, a suspensão bacteriana foi submetida a 80°C negativos por no mínimo uma hora. Posteriormente, esta suspensão foi novamente centrifugada a 30.000 g por 2 minutos e o sobrenadante foi utilizado para amplificação do DNA.

8.2. Amplificação do gene *rpoB*

Para a amplificação de um fragmento de cerca de 1.000 pb do gene *rpoB* foram utilizados os iniciadores CM7 (5'-AACCAGTTCCGCGTTGGCCTGG-3') e CM31b (5'-

CCTGAACAACACGCTCGGA-3') (Sigma-Genosys, The Woodlands, TX, EUA) (Drancourt *et al.*, 2001).

A reação de PCR foi feita num volume total de 25 µL contendo os seguintes componentes para a mistura: *Taq* DNA polimerase recombinante (1U) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), mistura de dNTP (250 µM cada) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), MgCl₂ (2 mM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), tampão PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), iniciadores CM7 e CM31b (12,5 pmoles cada), 3 µL de sobrenadante contendo o DNA molde e 16,7 µL de água purificada (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Os parâmetros para a amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 90 segundos; 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 10 segundos, anelamento a 55°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 50 segundos; e uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos (Mollet, Drancourt & Raoult, 1997).

Os produtos obtidos foram observados após corrida eletroforética em gel de agarose (1,5%) sob luz UV e purificados com a utilização do kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Alameda, CA, EUA). O seqüenciamento de ambas as fitas do DNA foi realizado na *DNA Sequencing Facility*, da University of California, Berkeley, EUA.

8.3. Análise das seqüências do gene *rpoB*

Após sobreposição das seqüências, fragmentos de 512 pb foram analisados pelo BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmar a identificação das amostras de *Klebsiellae* e, posteriormente, alinhados pelo “ClustalW Multiple Alignment do BioEdit Sequence Alignment Editor”, versão 7.0.4.1. As seqüências alinhadas foram examinadas para relacionamentos moleculares evolutivos pelo método de “neighbor-joining distance”,

usando Jukes & Cantor como parâmetro modelo. A árvore filogenética foi construída empregando-se o programa TREECON para Windows versão 1.3b (University of Konstanz).

As seqüências do *rpoB* das seguintes amostras foram obtidas do banco de dados do *Genbank* e incluídas na análise filogenética: *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae* ATCC 13883 (número de acesso U77444), *K. pneumoniae* subespécie *ozaenae* ATCC 11296 (número de acesso AF129445), *K. pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis* ATCC 13884 (número de acesso AF129446), *K. oxytoca* ATCC 13182 (número de acesso U77442), *K. variicola* ATCC BAA-830 (número de acesso AY367356), *R. planticola* ATCC 33531 (número de acesso AF129449), *R. terrigena* ATCC 33257 (número de acesso AF129448), *R. ornithinolytica* ATCC 31898 (número de acesso AF129447) e *Staphylococcus sciuri* subespécie *carnaticus* ATCC 700058 (número de acesso DQ120748), como grupo externo.

9. GENOTIPAGEM

Para a definição dos genótipos as amostras bacterianas foram avaliadas através da análise do polimorfismo do DNA após amplificação em reação da polimerase em cadeia utilizando iniciadores para seqüências conservadas intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR). O iniciador utilizado foi o ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (QIAGEN Inc., Alameda, CA, EUA) descrito por Versalovic, Koeuth & Lupski (1991).

9.1. Preparação do DNA

A amostra bacteriana em teste foi inoculada em ágar triptona de soja (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e incubada a 35°-37°C, por 16-18 horas, em aerobiose. O DNA foi extraído de acordo com Pellegrino e colaboradores (2002), com pequenas modificações, da seguinte forma: após o crescimento, (i) em 2 mL de tampão salina-fosfato (*phosphate buffer saline* – PBS) pH 7,2 foi preparada uma suspensão bacteriana de acordo com o padrão de turvação 2,0 da escala Mc Farland; (ii) após preparo, 1 mL desta suspensão foi transferido para *ependorf* capacidade 1,5-2,0 mL e centrifugado a 30.000 g por 6 minutos, a 4°C, sendo desprezado o sobrenadante; (iii) o sedimento resultante foi ressuspenso em 100 µL de água bi-destilada; (iv) a nova suspensão foi submetida à fervura durante 10 minutos para rompimento das células; (v) após fervura, a suspensão foi mergulhada em banho de gelo por 5 minutos e mantida a 20°C negativos por 12-18 horas; (vi) os debris celulares foram removidos por centrifugação (17.500 g por 5 minutos, a 4°C) e o sobrenadante recuperado e utilizado para amplificação do DNA.

9.2. Condições de amplificação

A reação de amplificação foi realizada em um volume total de 25 µL contendo 100 µM de cada dNTP, 7,5 pmoles do iniciador, *Taq* polimerase 1,5U (Biotools, Madri, Espanha), tampão PCR [75 mM tris-HCl (pH 9,0), 3 mM MgCl₂ 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄; Biotools, Madri, Espanha], 3 µL do DNA molde e 12 µL de água bi-destilada. Um controle negativo sem adição do DNA molde foi incluído em cada experimento. A mistura foi sujeita à amplificação que consistiu de um ciclo inicial de dois minutos a 94°C,

seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, um minuto a 54°C e quatro minutos a 72°C e, posteriormente, um ciclo final de um minuto a 72°C (Pellegrino *et al.*, 2002). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para corrida eletroforética foi utilizado como padrão de tamanho de DNA o 1 Kb DNA *ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A reprodutibilidade dos resultados em cada reação de PCR foi avaliada através do teste de preparação de DNA extraída de uma amostra de *R. planticola* ATCC 33531. O gel foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta.

9.3. Interpretação dos resultados

Os resultados foram analisados por inspeção visual e computadorizada. Para análise visual, os padrões de banda observados foram comparados dois a dois e classificados como tipos diferentes pela observação de uma ou mais bandas distintas. A análise computadorizada foi feita com o auxílio do programa GelComparII, versão 3,5 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) utilizando-se o índice de Dice e o método “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages” (UPGMA).

RESULTADOS

1. AMOSTRAS BACTERIANAS

No presente estudo, foram analisadas 122 amostras de *Klebsiellae* obtidas consecutivamente de 120 pacientes (62 ambulatoriais e 58 internados) atendidos no HU-UFJF, no período de março de 2002 a março de 2004. As amostras selecionadas foram isoladas a partir de urina (86 amostras, 71%), sangue (15, 12%), várias secreções (12, 10%), ponta de cateter (4, 3%), líquido peritoneal (3, 2%) e outros sítios (coleção abdominal e líquido de necrose pancreática) (2, 2%).

2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS AMOSTRAS

Todas as 122 amostras clínicas analisadas, exceto uma (K51), formaram colônias róseas características em ágar MacConkey, indicativas de fermentação de lactose e produção de ácido e, quando coradas pelo método de Gram, revelaram-se bacilos Gram-negativos. As 122 amostras investigadas mostraram-se negativas para oxidase, H₂S, arginina, ornitina e fenilalanina; eram fermentadoras de glicose, citrato positivo e imóveis. Em função deste perfil, todas foram confirmadas como amostras de *Klebsiellae* e pertencentes, portanto, ao gênero *Klebsiella* ou *Raoultella*.

Um total de 102 (84%) das 122 amostras de *Klebsiellae* foi incapaz de produzir indol a partir de triptofano, de assimilar histamina e D-melezitose e de crescer a 10°C. Neste total de amostras analisado, 25 (25%) mostraram de uma até três variações nos testes

de identificação realizados. Com base nestes resultados, todas estas 102 amostras foram classificadas como possíveis *K. pneumoniae* ou *K. variicola* (Kp/Kv). Dentre estas amostras, 89 (87%) foram positivas para a fermentação do adonitol e 13 (13%) foram negativas (amostras K1, K12, K14, K27, K44, K49, K54, K69, K80, K103, K110, K115 e K166) (Tabela 2).

Outras 19 (15%) das 122 amostras de Klebsiellae revelaram testes positivos para a produção de indol e crescimento a 10°C e negativo para a assimilação de histamina. Conforme mostra a Tabela 2, 7 (37%) amostras apresentaram resultados distintos das demais em um dos seguintes testes: 3 (16%) foram negativas para D-melezitose, 3 (16%) revelaram-se positivas para VM e 1 (5%) mostrou-se malonato negativa. Todas estas 19 amostras foram identificadas como prováveis *K. oxytoca*, visto que as variações observadas podem ocorrer nesse grupo bacteriano.

Finalmente, uma (1%) das 122 amostras de Klebsiellae foi positiva para a produção de indol, crescimento a 10°C e assimilação de histamina e negativa para ornitina e D-melezitose. Outros resultados dos testes de identificação estão apresentados na Tabela 2. Esta amostra foi identificada como provável *R. planticola*.

Nenhuma amostra das espécies *R. ornithinolytica* ou *R. terrigena* foi identificada na coleção estudada.

3. ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DO GENE *rpoB*

Um total de 47 amostras selecionadas dos grupos identificados no estudo foram submetidas à análise das seqüências do gene *rpoB*: 30 de prováveis Kp/Kv, 15 de prováveis

K. oxytoca e 2 de prováveis *R. planticola*, ambas obtidas de um mesmo paciente e incluídas apenas nos estudos de seqüenciamento para controle interno.

A pesquisa BLASTn para similaridade entre as seqüências do *rpoB* obtidas no presente estudo e aquelas depositadas no *GenBank*, conduziu à observação de similaridades entre 98% e 100% com cepas conhecidas, permitindo concluir pela identificação em espécie de todas as amostras avaliadas. As seqüências das 30 amostras de prováveis Kp/Kv foram separadas em dois grupos: 25 amostras apresentaram de 98% a 100% de similaridade com cepas conhecidas de *K. pneumoniae* (grupo Kp) e outras 5 revelaram de 99% a 100% de similaridade com cepas conhecidas de *K. variicola* (grupo Kv). Os resultados do teste de fermentação do adonitol, único teste proposto até os dias atuais para separar *K. pneumoniae* (positiva) de *K. variicola* (negativa), revelou que o grupo Kp incluiu 22 amostras positivas e três negativas, e o grupo Kv incluiu quatro amostras negativas e uma positiva.

As seqüências do *rpoB* de 15 amostras de prováveis *K. oxytoca* exibiram percentuais de similaridade que variaram de 98% a 100% com cepas conhecidas de *K. oxytoca*, formando o grupo Ko. E, finalmente, as duas amostras de prováveis *R. planticola* (K111 e K112) exibiram 98% de similaridade com cepas conhecidas dessa espécie, formando o grupo Rp/Ro, incluindo a cepa-padrão *R. planticola* ATCC 33531.

Conforme mostra a Figura 1, a análise filogenética das seqüências do gene *rpoB* também refletiu a separação das amostras investigadas nos quatro grupos (Kp, Kv, Rp/Ro e Ko). O grupo Kp, com as seqüências das 25 amostras de prováveis *K. pneumoniae*, incluiu de fato as 3 amostras (K14, K103 e K110) adonitol negativas e as cepas-padrão *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae* ATCC 13883, *K. pneumoniae* subespécie *ozaenae* ATCC 11296 e *K. pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis* ATCC 13884; o grupo Kv incluiu as seqüências das 4 amostras (K27, K49, K115 e K166) adonitol negativas, da

amostra (K40) adonitol positiva, e da cepa-padrão *K. variicola* ATCC BAA-830; o grupo Rp/Ro incluiu as duas amostras de prováveis *R. planticola* e as cepas-padrão *R. planticola* ATCC 33531 e *R. ornithinolytica* ATCC 31898 e, finalmente, o grupo Ko incluiu todas as amostras de prováveis *K. oxytoca*, exceto uma (K82), e a cepa-padrão *K. oxytoca* ATCC 13182.

Os fragmentos das seqüências do gene *rpoB* analisados encontram-se depositados no *GenBank* sob os números de acesso DQ415473-DQ415498 (*K. pneumoniae*), DQ415458-DQ415472 (*K. oxytoca*), DQ415499-DQ415503 (*K. variicola*) e DQ415504-DQ415505 (*R. planticola*).

4. GENOTIPAGEM

Foram investigadas, através da técnica de ERIC-PCR, 94 amostras de Klebsiellae, incluindo todas as amostras de *K. oxytoca* e *R. planticola*. Dentre as 73 amostras de Kp/Kv, foram incluídas todas as 29 produtoras de ESBL, as 20 das 25 confirmadas como *K. pneumoniae* e as cinco identificadas como *K. variicola*. Também foram analisadas por esta técnica três amostras de referência (*K. pneumoniae* ATCC 700603; *R. planticola* ATCC 33531; *R. terrigena* ATCC 33257) e uma amostra previamente caracterizada no LEMIB/IMPPG (*K. oxytoca* AP). Em cada amplificação foi incluída, como controle, a cepa-padrão *R. planticola* ATCC 33531.

Cada amostra apresentou de 4 a 12 bandas distintas ao ERIC-PCR, variando de 200 a 5.000 pb. A Figura 2 ilustra exemplos de diferentes perfis representativos de bandas obtidos com amostras de Klebsiellae. Pela análise da Figura 2-A podemos observar que as amostras K43 e K56 (linhas 2 e 3) apresentaram o mesmo perfil de bandas (essas duas

amostras também constituíram um agrupamento na árvore filogenética), o mesmo sendo observado para a K78 e K89 (linhas 6 e 8). Todas estas amostras foram identificadas como *K. oxytoca*. Posteriormente, a amostra K78 foi excluída do presente estudo visto que pertencia ao mesmo paciente da K89.

A Figura 2-B mostra que as amostras K111 e K112 (linhas 9 e 10) revelaram perfis eletroforéticos idênticos, o que pôde ser explicado pelo fato de que ambas tratavam-se de *R. planticola* e foram obtidas do mesmo paciente. Como já mencionado, estas amostras foram inseridas apenas nas investigações moleculares. Esta Figura apresenta, ainda, um exemplo de perfil de bandas observado para *K. variicola* (amostra K49 – linha 8). A inspeção visual revelou que cada uma das amostras com a identificação final de *K. variicola* apresentou um perfil distinto.

Pela análise da Figura 2-C observa-se que apenas as amostras K62 e K65 revelaram perfis de bandas similares, formando um agrupamento. Com exceção da amostra *R. planticola* ATCC 33531 (linha 10), todas as amostras apresentadas nesta Figura foram identificadas como Kp/Kv, sendo que três delas (K71, K90 e K93) foram classificadas pelas seqüências do gene *rpoB* como *K. pneumoniae*.

Após inspeção visual, a análise computadorizada confirmou a diversidade genética observada para as quatro espécies analisadas (*K. pneumoniae*, *K. variicola*, *K. oxytoca* e *R. planticola*). Entre as 94 amostras de Klebsiellae tipadas, foram detectados 71 genótipos distintos de Kp/Kv, incluindo os 20 genótipos de *K. pneumoniae* e os cinco de *K. variicola* caracterizados por identificação molecular, e 17 de *K. oxytoca*. Foram observados apenas três agrupamentos genéticos: um de Kp/Kv formado pelas amostras K62 e K65, outro constituído pelas amostras K43 e K56 de *K. oxytoca* e, finalmente, um grupo composto pelas amostras K111 e K112 de *R. planticola*.

A Figura 3 apresenta o dendrograma realizado a partir dos perfis de bandas obtidos pela técnica de ERIC-PCR para 20 amostras de *K. pneumoniae*, cinco de *K. variicola* e duas de *R. planticola* seqüenciadas. Conforme mostra esta Figura, foram observados 20 genótipos distintos de *K. pneumoniae* e cinco de *K. variicola*. Apesar de este dendrograma apresentar as amostras K22 e K26 em um mesmo agrupamento genético, a análise visual do perfil de bandas não confirmou este dado sendo, portanto, desconsiderado. O agrupamento das amostras K111 e K112 observado na Figura 3 também foi detectado visualmente (Figura 2-B). Pela análise da Figura 3 podemos verificar que, com exceção da amostra K166 identificada como *K. variicola*, as demais 4 amostras se organizaram em um mesmo grupo, que incluiu uma amostra adonitol negativo (K110) cuja identificação final foi *K. pneumoniae*.

Os dendrogramas realizados a partir dos perfis de bandas obtidos pela técnica de ERIC-PCR para as amostras de *K. oxytoca* e *R. planticola* seqüenciadas estão apresentados nas Figuras 4-A e 4-B. Pela análise destas Figuras podemos observar 13 genótipos distintos de *K. oxytoca* e apenas um agrupamento genético constituído pelas amostras K43 e K56, também revelado pela inspeção visual. A Figura 4-B mostra o grupo clonal formado pelas amostras K111 e K112 identificadas como *R. planticola* já mostrado na Figura 3.

5. SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E PRODUÇÃO DE ESBL

Todas as amostras de Klebsiellae incluídas neste estudo foram avaliadas quanto à susceptibilidade a 13 antimicrobianos através do teste de difusão em ágar e produção de ESBL.

As porcentagens de resistência antimicrobiana observadas nas 102 amostras de Kp/Kv e 19 de *K. oxytoca* estão descritas na Tabela 3. A amostra de *R. planticola* apresentou resistência somente à ampicilina. Observa-se na Tabela 3 que todas as amostras analisadas foram resistentes à ampicilina e susceptíveis ao imipenem. Os demais percentuais de resistência variaram de 5% a 63%.

Uma única amostra de Kp/Kv (K39), cuja identificação foi confirmada posteriormente pelo seqüenciamento do *rpoB* como *K. pneumoniae*, apresentou resistência a todos os antimicrobianos avaliados, exceto imipenem. Quando se considerou a resistência concomitante entre antimicrobianos de diferentes classes, foram observadas 41 (40%) de 102 amostras de Kp/Kv e 12 (63%) de 19 *K. oxytoca* multirresistentes. Neste aspecto, a análise filogenética (Figura 1) revelou que quatro amostras de Kp/Kv (K27, K40, K115 e K166) que apresentaram co-resistência foram identificadas como *K. variicola*.

A produção de ESBL foi observada em 29 (28%) das 102 amostras de Kp/Kv. Dentre estas amostras, apenas duas (K62 e K65) apresentavam o mesmo genótipo no ERIC-PCR. Nove (47%) de 19 *K. oxytoca* foram ESBL positivas, sendo apenas duas (K43 e K56) agrupadas em um único genótipo. Entre as 29 amostras de Kp/Kv produtoras de ESBL, três (K40, K115 e K166) tratavam-se de *K. variicola*. Não foi observada produção de ESBL pela amostra de *R. planticola*.

Tabela 2. Resultados dos testes de identificação utilizados na diferenciação de 122 amostras de *Klebsiellae*.

Teste de Identificação	Número (%) de amostras com teste positivo		
	<i>K. pneumoniae/K. variicola</i> (total = 102)	<i>K. oxytoca</i> (total = 19)	<i>R. planticola</i> (1 amostra)
Lactose/Sacarose	101 (99)	19 (100)	1
H ₂ S	102 (0)	19 (0)	0
Indol	102 (0)	19 (100)	1
Motilidade	102 (0)	19 (0)	0
Citrato	102 (100)	19 (100)	1
Lisina	99 (97)	19 (100)	1
Ornitina	102 (0)	19 (0)	0
Arginina	102 (0)	19 (0)	0
Fenilalanina	102 (0)	19 (0)	0
Vermelho de Metila	5 (5)	3 (16)	1
Voges-Proskauer	98 (96)	19 (100)	0
Urease	98 (96)	19 (100)	1
Adonitol	89 (87)	NR	NR
Malonato	96 (94)	18 (95)	1
L-sorbose	47 (46)	19 (100)	1
Crescimento a 10°C	102 (0)	19 (100)	1
Histamina	102 (0)	19 (0)	1
D-Melezitose	102 (0)	16 (84)	0

NR: teste não-realizado.

Tabela 3. Perfis de resistência antimicrobiana de 121 amostras de *Klebsiellae*.

Agente Antimicrobiano	Número (%) de amostras resistentes	
	<i>K. pneumoniae/K. variicola</i> (total = 102)	<i>K. oxytoca</i> (total = 19)
Amicacina	33 (32)	5 (26)
Amoxicilina/Ácido Clavulânico	7 (8)	6 (32)
Ampicilina	102 (100)	19 (100)
Aztreonam	19 (19)	9 (47)
Cefepime	9 (9)	5 (26)
Cefoxitina	9 (9)	3 (16)
Ceftazidima	14 (14)	1 (5)
Cefotaxima	25 (25)	8 (42)
Cefalotina	43 (42)	12 (63)
Ciprofloxacina	12 (12)	6 (32)
Gentamicina	23 (23)	9 (47)
Imipenem	0	0
Sulfametoxazol/Trimetoprim	36 (35)	8 (42)

Figura 1. Árvore filogenética obtida com seqüências parciais do *rpoB* (512 pb) de 47 amostras de *Klebsiellae* e amostras-padrão construída pelo método de *neighbor-joining distance*, usando Jukes & Cantor como parâmetro modelo. Os números dentro do dendrograma indicam a ocorrência (%) de repetições das ramificações em 100 vezes (valores de *bootstrap*). Apenas valores acima de 50 são mostrados. A escala de barra indica divergência de 2%. As setas indicam os grupos Kp, Kv, Rp/Ro e Ko. Os grupos filogenéticos de *K. pneumoniae* são KpI, KpII-B e KpIII e os de *K. oxytoca* são KoI, KoII, KoIV e KoVI.

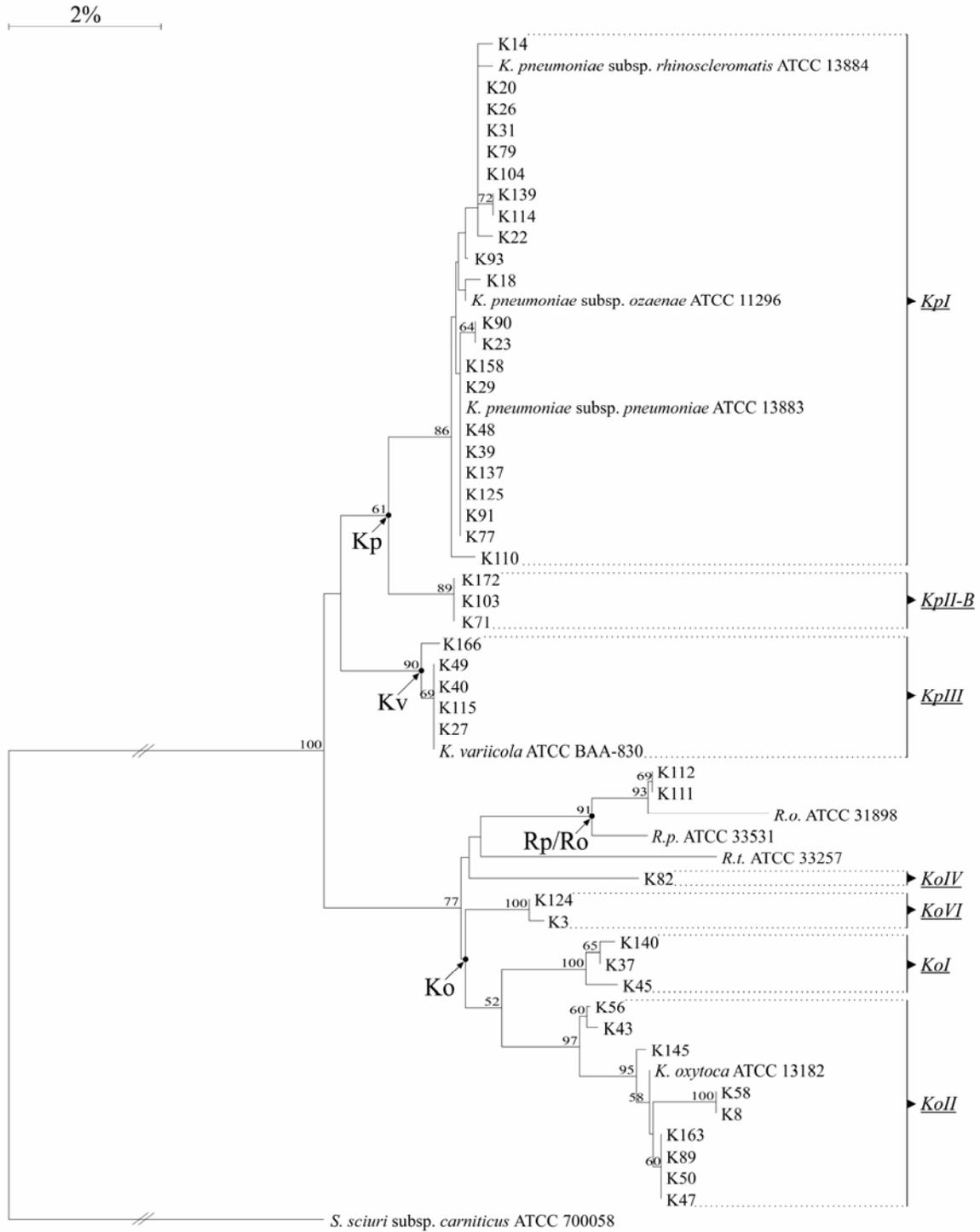


Figura 2. Perfis de bandas obtidos com amostras de Klebsiellae, gerados pela técnica de amplificação de fragmentos de DNA em reação em cadeia da polimerase utilizando iniciador para seqüências conservadas intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR).

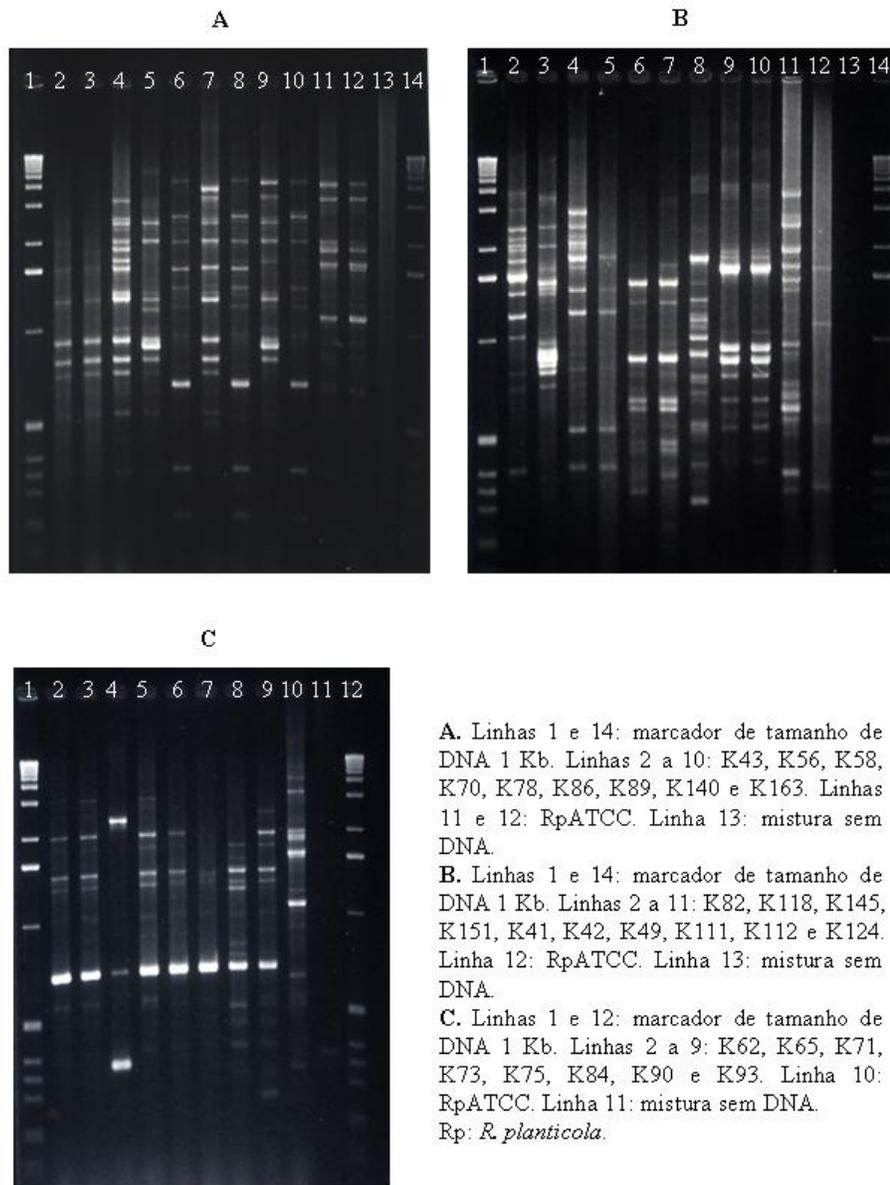
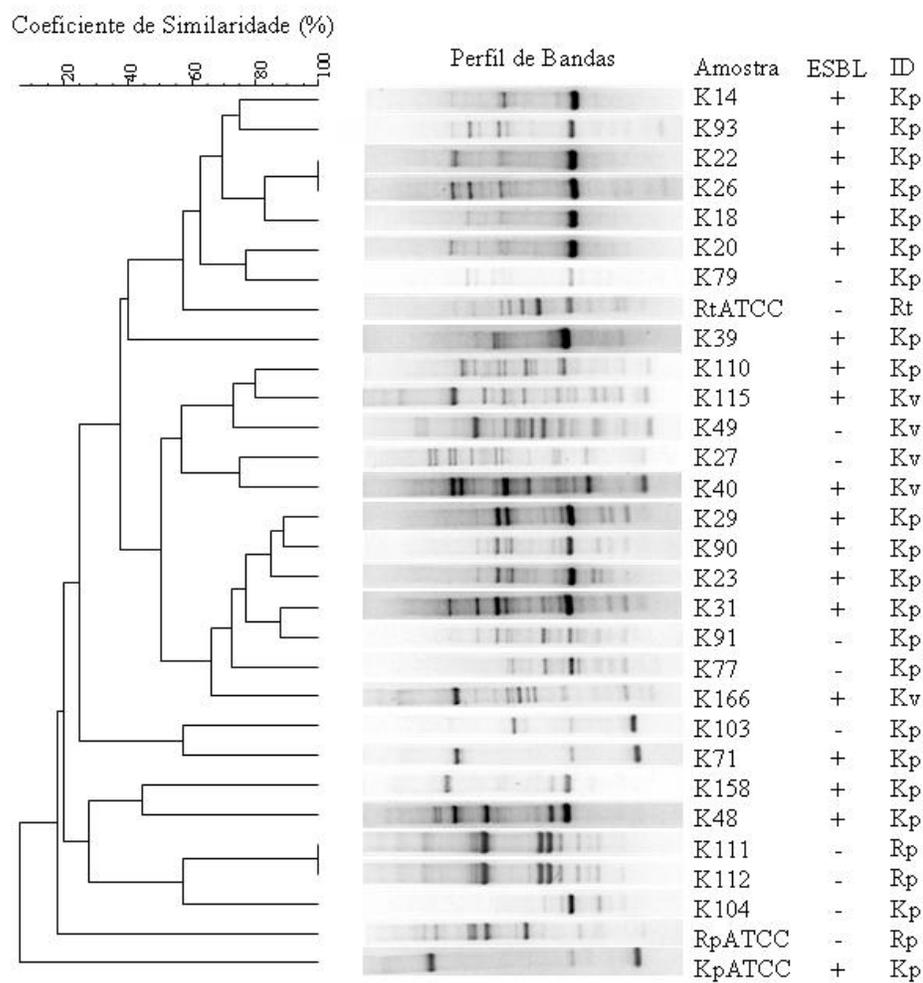


Figura 3. Dendrograma realizado a partir dos perfis de bandas obtidos pela técnica de ERIC-PCR para as amostras de *K. pneumoniae*, *K. variicola* e *R. planticola* seqüenciadas.



ESBL: β -lactamase de espectro estendido

ID: identificação final

Kp: *K. pneumoniae*

Kv: *K. variicola*

KpATCC: *K. pneumoniae* ATCC® 700603

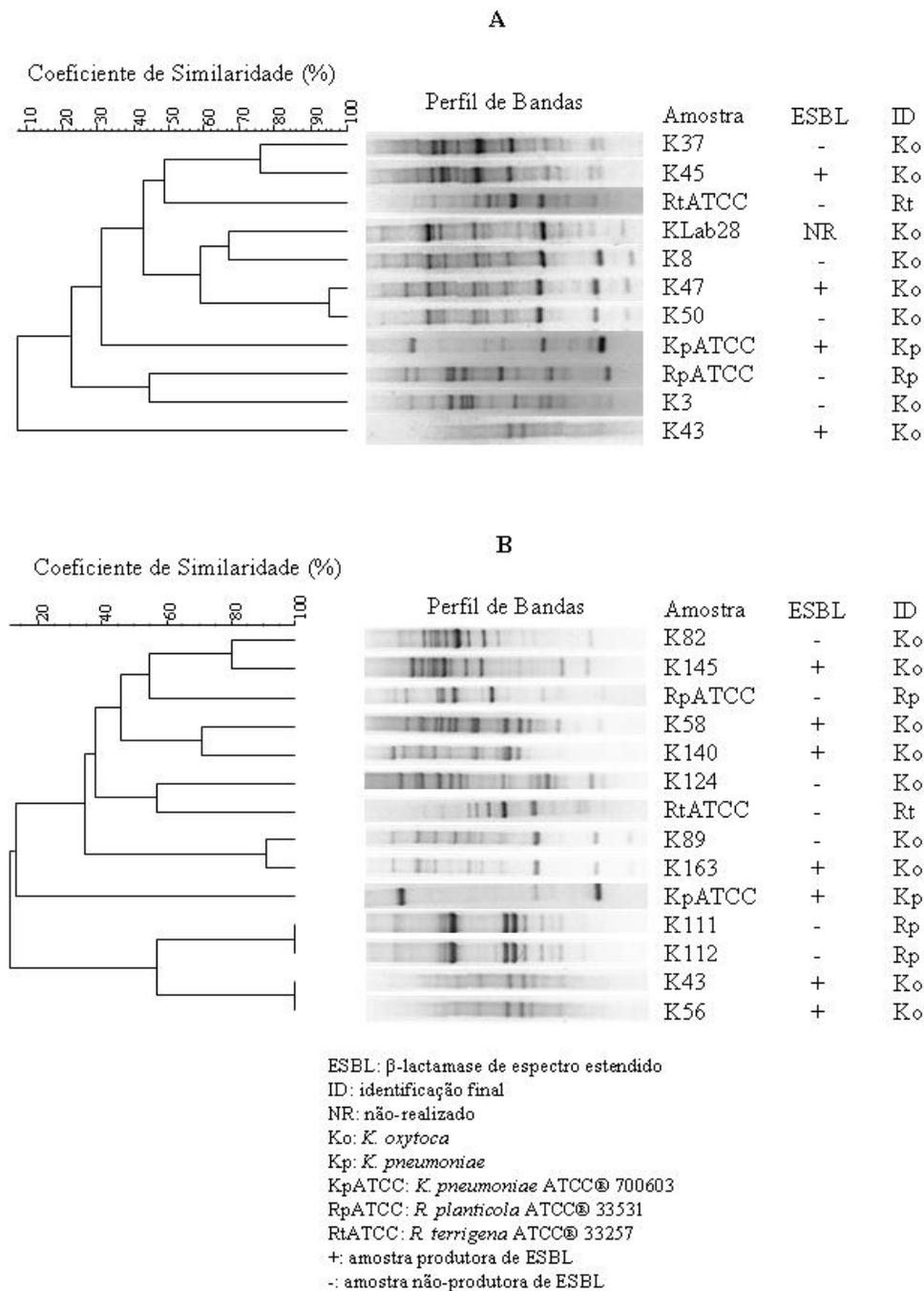
RpATCC: *R. planticola* ATCC® 33531

RtATCC: *R. terrigena* ATCC® 33257

+: amostra produtora de ESBL

-: amostra não-produtora de ESBL

Figura 4. Dendrograma realizado a partir dos perfis de bandas obtidos pela técnica de ERIC-PCR para as amostras de *K. oxytoca* e *R. planticola* seqüenciadas.



DISCUSSÃO

A correta identificação de espécies de Klebsiellae é complexa, não sendo realizada na rotina dos laboratórios de microbiologia clínica. Até o presente, os métodos fenotípicos de identificação disponíveis apresentam limitações (Brisse & Duijkeren, 2005; Hansen *et al.*, 2004; Monnet & Freney, 1994; Monnet *et al.*, 1991). Entretanto, a caracterização precisa de amostras de Klebsiellae se faz necessária para a melhor compreensão da taxonomia e epidemiologia molecular desse grupo bacteriano.

No presente estudo, foram avaliadas 122 amostras de Klebsiellae obtidas, consecutivamente, de vários espécimes clínicos de 120 pacientes atendidos no HU/UFJF no período de março de 2002 a março de 2004. Para a caracterização fenotípica, todas as amostras foram submetidas a 20 testes, incluindo quatro não utilizados habitualmente nas rotinas de identificação de enterobactérias (crescimento a 10°C, fermentação de L-sorbose e assimilação de histamina e D-melezitose). Na análise dos resultados obtidos, amostras que poderiam ser identificadas como *K. pneumoniae* ou *K. variicola* foram as mais frequentes (84%; 102). A análise de um segmento de 512 pb do gene *rpoB* de 30 (29%) destas amostras permitiu identificar 25 (83%) como *K. pneumoniae* e 5 (17%) como *K. variicola*. Um total de 19 (15%) das 122 amostras foi identificado como *K. oxytoca*; essa identificação foi confirmada por meio da análise de um fragmento do gene *rpoB* de 15 (79%) dessas amostras. Finalmente, uma amostra, identificada como *K. oxytoca* no laboratório de origem, foi classificada (e confirmada) como *R. planticola* no presente estudo. Esta caracterização como *R. planticola* foi baseada nos testes histamina positivo e

ornitina e D-melezitose negativos (Monnet & Freney, 1994). Na coleção analisada não foram observadas amostras de *R. terrigena* ou *R. ornithinolytica*.

Considerando-se *K. pneumoniae*/*K. variicola* e *K. oxytoca*, as frequências de isolamento observadas para essas espécies (84% e 15%, respectivamente) foram próximas daquelas descritas por Hansen, Gottschau & Kolmos em 1998 (*K. pneumoniae* 76% e *K. oxytoca* 24%) e por Watanakunakorn & Jura em 1991 (86% para *K. pneumoniae* e 13% para *K. oxytoca*).

No que diz respeito ao isolamento de *K. variicola*, ainda são poucos os estudos sobre sua frequência, visto que essa nova espécie foi descrita recentemente (Rosenblueth *et al.*, 2004). Segundo Rosenblueth e colaboradores (2004), *K. variicola* representa menos que 10% de amostras clínicas de Klebsiellae previamente identificadas como *K. pneumoniae*. Brisse e colaboradores (2004) relataram que, ao investigarem 420 amostras clínicas de *K. pneumoniae*, 46 (11%) foram identificadas como pertencentes ao grupo filogenético KpIII, o qual corresponde a *K. variicola* (Rosenblueth *et al.*, 2004). Estes autores relataram, ainda, que amostras do grupo KpIII nunca foram observadas em infecções de trato urinário. O único estudo realizado com amostras clínicas animais revelou uma frequência de isolamento de 8% de *K. pneumoniae* grupo KpIII (Brisse & Duijkeren, 2005). No presente estudo, foram identificadas 5 amostras de *K. variicola* (17%) entre as 30 de Kp/Kv analisadas por meio do seqüenciamento do gene *rpoB*, porcentagem superior àquelas descritas por Rosenblueth e colaboradores (2004) e Brisse e colaboradores (2004). Outra observação que merece destaque é o isolamento de uma amostra de *K. variicola* (K49) a partir de urina de um paciente do sexo feminino hospitalizado, o que demonstra a presença de KpIII em amostras isoladas de infecções do trato urinário, o que diverge do relato de Brisse e colaboradores (2004).

A frequência relativa de isolamento de *R. planticola* (1%) observada no presente estudo foi menor do que a relatada por Monnet e colaboradores (1991) na França (8% de 204 amostras procedentes de hospitais cardiológicos e neurológicos), Mori e colaboradores (1989) no Japão (19% de 439 amostras procedentes do Laboratório Central do Hospital Universitário de Nagoya e de vários hospitais gerais regionais) e Podschun e colaboradores (1998) na Alemanha (9% de 131 amostras procedentes da Clínica Pediátrica da Universidade de Heidelberg). Entretanto, a frequência por nós observada foi similar àquela detectada por Westbrook e colaboradores nos Estados Unidos: 0,4% de 395 amostras da coleção de culturas do “Centers for Disease Control and Prevention – CDC”, que incluiu 43 de *K. oxytoca* obtidas de recém-nascidos, e de 84 amostras clínicas recentes procedentes de quatro laboratórios hospitalares de Atlanta. Nestes estudos descritos, foi possível caracterizar amostras de Klebsiellae como *R. planticola* com esquemas de identificação diferentes daquele utilizado no presente estudo.

A utilização dos 20 testes propostos permitiu a diferenciação entre amostras de *K. pneumoniae* ou *K. variicola*, *K. oxytoca* e *R. planticola* de forma fácil e acurada. De acordo com Rosenblueth e colaboradores (2004), *K. variicola* não é capaz de fermentar adonitol, o que implica em uma característica diferencial de *K. pneumoniae*. Porém, algumas amostras de *K. pneumoniae* podem ser adonitol negativas, conforme já descrito por Farmer e colaboradores em 1985 e posteriormente por Winn Jr. e colaboradores em 2006. Entretanto, os resultados de Farmer e colaboradores (1985) devem ser analisados com a ressalva de que testes moleculares de referência para a confirmação da identificação fenotípica não foram empregados por estes autores. Assim sendo, a identificação fenotípica de *K. variicola* baseada somente no teste de adonitol negativo não é possível; excluindo as 5 amostras que agruparam com *K. variicola* ATCC BAA-830 (4 adonitol negativo e 1 adonitol positivo),

entre as 25 de *K. pneumoniae* confirmadas pelo seqüenciamento do gene *rpoB*, 3 amostras (12%) foram negativas para esse carboidrato. Por outro lado, uma amostra confirmada como *K. variicola* (K40) revelou fermentação do adonitol. Em 2004, esta mesma observação já havia sido feita por Brisse e colaboradores: 2 (4%) de 46 amostras confirmadas pelo seqüenciamento do gene *parC* como KpIII (*K. variicola*) eram adonitol positivo. Portanto, nos dias atuais, não é possível a diferenciação entre *K. pneumoniae* e *K. variicola* baseada apenas em testes bioquímicos, sendo essa uma área que necessita de estudos adicionais. Atualmente, a espécie *K. variicola* é diferenciada de *K. pneumoniae* e de outras espécies de Klebsiellae somente pelo seqüenciamento dos genes *gyrA*, *infB*, *mdh*, *nifH*, *parC*, *phoE*, *rpoB* e pelos baixos níveis de hibridização DNA-DNA com outras espécies.

Em 1997, Mollet, Drancourt & Raoult demonstraram a aplicação do estudo de seqüências do gene *rpoB* como uma ferramenta alternativa ao RNAr 16S para a identificação genotípica universal de bactérias. Em 2004, Drancourt, Berger & Raoult relataram que 0,5% a 1% de todas as amostras bacterianas processadas na Unité des Rickettsies, Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée, França, um serviço de referência para isolamento e identificação de bactérias aeróbias, anaeróbias, micobactérias e espiroquetas, não puderam ser classificadas através de suas características fenotípicas, necessitando, portanto, de métodos moleculares para identificação. No ano seguinte, Drancourt & Raoult (2005) propuseram como parâmetro que duas amostras bacterianas pertenceriam a espécies diferentes se elas compartilhassem menos de 97% de similaridade nas seqüências do gene que codifica RNAr 16S ou do *rpoB*.

No presente estudo, a pesquisa BLASTn revelou porcentagens de similaridade das seqüências *rpoB* superiores a 98% para a classificação sugerida pelos perfis bioquímicos

das amostras. O seqüenciamento deste gene permitiu a confirmação da identificação fenotípica de 15 (100%) prováveis *K. oxytoca* e 2 (100%) prováveis *R. planticola*. Este seqüenciamento possibilitou, ainda, a detecção de 5 amostras de *K. variicola* e 25 de *K. pneumoniae* entre as 30 amostras de Kp/Kv seqüenciadas. Desta forma, somente o método genotípico pôde separar *K. variicola* de *K. pneumoniae* entre amostras de Kp/Kv.

Além da análise das similaridades observadas pelo BLASTn para a classificação das amostras, as seqüências do *rpoB* foram utilizadas para a construção de uma árvore filogenética. A organização desta árvore confirmou a reunião das amostras nos grupos de identificação descritos acima. A análise da árvore pelo método de “neighbor-joining distance” mostrou que cada ramo foi confirmado por moderados valores de *bootstrap*. Estes valores de *bootstrap* são similares àqueles previamente relatados para análise do gene RNAr 16S para *Enterobacteriaceae* (Drancourt *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 1997; Spröer *et al.*, 1999) e do gene *rpoB* para *Klebsiellae* (Drancourt *et al.*, 2001; Fevre *et al.*, 2005^a; Fevre *et al.*, 2005^b; Rosenblueth *et al.*, 2004).

Nesta árvore filogenética observa-se, ainda, que *K. pneumoniae* subespécie *ozaenae* e *K. pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis* estão proximamente relacionadas à *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae* (grupo Kp), em concordância com relatos anteriores (Brisse & Verhoef, 2001; Boye & Hansen, 2003; Drancourt *et al.*, 2001). *K. granulomatis* não foi incluída nesta análise filogenética porque amostras dessa espécie não são cultiváveis em meios convencionais (Carter *et al.*, 1997). Uma outra árvore filogenética foi construída com base nas seqüências do gene *rpoB* das 25 amostras de *K. pneumoniae* e das cinco amostras de *K. variicola*, das cepas-padrão *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae* ATCC 13883, *K. pneumoniae* subespécie *ozaenae* ATCC 11296, *K. pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis* ATCC 13884 e *K. variicola* ATCC BAA-830, e nos grupos

clonais recentemente descritos por Fevre e colaboradores (2005^b). Esta nova árvore permitiu definir as amostras de *K. pneumoniae* e *K. variicola* seqüenciadas no presente estudo da seguinte forma: K14, K18, K20, K22, K23, K26, K29, K31, K39, K48, K77, K79, K90, K91, K93, K104, K110, K114, K125, K137, K139, K158, *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae* ATCC 13883, *K. pneumoniae* subespécie *ozaenae* ATCC 11296 e *K. pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis* ATCC 13884 como pertencentes ao grupo KpI; K71, K103 e K172 – grupo KpII-B; e K27, K40, K49, K115, K166 e *K. variicola* ATCC BAA-830 – grupo KpIII.

O grupo Ko (Figura 1) não incluiu a amostra K82 que mostrou um perfil fenotípico compatível com provável *K. oxytoca* (Tabela 1), apesar de ter sido a única amostra malonato negativo entre as 19 *K. oxytoca* analisadas. A pesquisa BLASTn revelou, no entanto, 99% de similaridade entre as seqüências do *rpoB* da amostra K82 e a cepa de *K. oxytoca* número de acesso AJ871806, o que permitiu sua classificação como *K. oxytoca*. O mesmo procedimento foi feito como descrito acima e uma nova árvore filogenética foi construída com base nas seqüências do gene *rpoB* das 15 amostras de *K. oxytoca*, incluindo a K82, e a cepa-padrão *K. oxytoca* ATCC 13182, e nos cinco grupos clonais de *K. oxytoca* recentemente descritos por Fevre e colaboradores (2005^a). Esta nova análise filogenética permitiu definir as amostras de *K. oxytoca* do presente estudo da seguinte forma: K8, K43, K47, K50, K56, K58, K89, K145, K163 e *K. oxytoca* ATCC 13182 como pertencentes ao grupo KoII; K37, K45 e K140 – grupo KoI; K3 e K124 – grupo KoVI; e K82 – grupo KoIV.

A árvore filogenética incluiu as cepas-padrão *R. ornithinolytica* ATCC 31898 e *R. planticola* ATCC 33531 no grupo Rp/Ro, juntamente com duas amostras de *R. planticola* da coleção estudada (K111 e K112). Assim sendo, a análise baseada no seqüenciamento do

rpoB com 512 pb não pôde separar estas espécies. Esta mesma observação já havia sido feita por Brisse & Verhoef (2001) que, fundamentados na análise das seqüências dos genes *gyrA* e *parC* e de dados de ribotipagem, demonstraram que *R. planticola* e *R. ornithinolytica* não puderam ser filogeneticamente separadas. Boye & Hansen (2003) observaram que *R. ornithinolytica* e *R. planticola* têm um alto nível de similaridade entre suas seqüências de RNAr 16S e pertencem ao mesmo grupo genético. Martínez e colaboradores (2004) relataram que ainda não está resolvido se *R. ornithinolytica* é um grupo independente, mas as evidências apontam para o fato de que amostras dessa espécie pertençam à espécie *R. planticola*. Entretanto, quando fizemos a pesquisa BLASTn com cerca de 1000 pb do gene *rpoB* das duas amostras caracterizadas fenotipicamente como prováveis *R. planticola* (K111 e K112), pudemos diferenciá-las de *R. ornithinolytica*. Além disto, o teste bioquímico de descarboxilação de ornitina permite a separação de amostras pertencentes a estas espécies (Farmer *et al.*, 1985; Boye & Hansen, 2003; Hansen *et al.*, 2004; Monnet & Freney, 1994).

Considerando o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, todas as 122 amostras analisadas foram resistentes à ampicilina, como esperado para Klebsiellae (Livermore, 1995; Stock & Wiedemann, 2001; Haeggman *et al.*, 2004). Todas as variantes de β -lactamases cromossômicas de *K. pneumoniae* conferem resistência à ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina, mas não aos β -lactâmicos de espectro estendido (Arakawa *et al.*, 1986; Babini & Livermore, 2000; Chaves *et al.*, 2001; Haeggman, Löfdahl & Burman, 1997). *K. oxytoca* é naturalmente resistente às amino e carboxi-penicilinas e muitas amostras são resistentes ao aztreonam e às cefalosporinas de terceira geração, com a exceção característica de ceftazidima (Livermore, 1995). De forma semelhante às amostras de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, aquelas de *K. variicola* foram descritas como naturalmente

resistentes à ampicilina e carbenicilina (Rosenblueth *et al.*, 2004). As porcentagens de resistência apresentadas na Tabela 3 demonstram que as amostras de *K. oxytoca* foram mais resistentes do que as de prováveis *K. pneumoniae/K. variicola*, exceto para amicacina e ceftazidima.

Amostras clínicas de Klebsiellae são freqüentemente multirresistentes, com uma proporção crescente daquelas produtoras de ESBL (Livermore, 1995; Podschun & Ulmann, 1998; Sader *et al.*, 2004). Entre as 122 amostras de Klebsiellae testadas, 41 (40%) de 102 prováveis *K.pneumoniae/K. variicola* e 12 (63%) de 19 *K. oxytoca* eram multirresistentes. Considerando-se os dados genotípicos de identificação, 17 (68%) de 25 amostras de *K. pneumoniae*, 11 (73%) de 15 *K. oxytoca* e 4 (80%) de 5 *K. variicola* (K27, K40, K115 e K166) revelaram resistência a três ou mais antimicrobianos. Estes resultados diferem daqueles observados por Brisse e colaboradores (2000). Estes autores, ao investigarem a epidemiologia da resistência às quinolonas e da resistência concomitante a outras classes de antibióticos em 445 amostras de *K. pneumoniae* e 238 de *K. oxytoca*, observaram níveis mais elevados de resistência para *K. pneumoniae* do que para *K. oxytoca*. Posteriormente, Brisse e colaboradores (2004) relataram que os percentuais de resistência observados para KpIII (*K. variicola*) foram similares ou menores do que aqueles detectados em *K. oxytoca*, o que também pôde ser observado no presente estudo.

A produção de ESBL foi observada em 28% (29 de 102) das amostras de Kp/Kv e 47% (9 de 19) das amostras de *K. oxytoca*. Considerando-se as amostras seqüenciadas, 15 (60%) de 25 *K. pneumoniae*, 8 (53%) de 15 *K. oxytoca* e 3 (60%) de 5 *K. variicola* (K40, K115 e K166) revelaram produção de ESBL. Segundo Sader e colaboradores (2004), no Brasil e na América Latina os percentuais de amostras de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, especialmente *K. pneumoniae* e *E. coli*, estão entre os maiores do mundo. Além da

resistência à cefalosporinas, penicilinas de amplo-espectro e monobactâmicos, estas amostras também têm mostrado altas taxas de resistência à maioria dos agentes antimicrobianos, inclusive aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, dados também observados no presente estudo (Tabela 3). Entretanto, os percentuais de resistência e produção de ESBL brasileiros apresentados no estudo de Sader e colaboradores (2004) foram obtidos com dados procedentes de apenas cinco centros incluídos no programa SENTRY e localizados nas cidades de Brasília, Florianópolis, Porto Alegre, Rio de Janeiro e São Paulo, não contemplando nenhum participante, por exemplo, do estado de Minas Gerais. De acordo com Brisse e colaboradores (2004), a taxa de resistência em amostras de KpI (*K. pneumoniae*) para muitos agentes antimicrobianos foi duas ou três vezes maiores do que aquelas detectadas em KpIII (*K. variicola*). Entretanto, o perfil de resistência aos antimicrobianos observado nas amostras de *K. variicola* da coleção investigada foi distinto daquele previsto para essa espécie, visto que quatro amostras foram resistentes a três ou mais antimicrobianos e três revelaram-se ESBL positivas. Ressalta-se que no presente estudo é apresentado o primeiro relato de produção de ESBL em amostras de *K. variicola*.

A amostra de *R. planticola* foi resistente somente à ampicilina e não revelou produção de ESBL. Este mesmo perfil foi previamente observado em 13 amostras de *R. planticola* obtidas de neonatos atendidos na Clínica Pediátrica da Universidade de Heidelberg, na Alemanha, no período de agosto de 1993 a agosto de 1994 (Podschun *et al.*, 1998).

No presente estudo, os resultados da tipagem obtidos pela técnica de ERIC-PCR revelaram grande diversidade de genótipos, o que sugere que a transmissão cruzada de amostras entre os pacientes não foi importante durante o período do estudo. Além disto, a diversidade genotípica observada evidenciou que os resultados obtidos pela análise do gene

rpoB refletiram a investigação de uma variedade de cepas. Provavelmente, os métodos empregados poderão ser aplicados a coleções de amostras de outros locais. Uma grande diversidade genética para amostras de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *R. planticola* já havia sido anteriormente observada por Brisse & Verhoef (2001). Estes autores, ao investigarem uma coleção composta por 86 amostras de *K. pneumoniae*, 30 de *K. oxytoca* e quatro de *R. planticola* utilizando a técnica de RAPD, detectaram 70 genótipos distintos de *K. pneumoniae* e genótipos diferentes para cada amostra de *K. oxytoca* e *R. planticola* estudada.

CONCLUSÕES

1. A utilização de um esquema de identificação composto por 20 testes, incluindo quatro não realizados rotineiramente em laboratórios de microbiologia clínica para classificação de enterobactérias, permitiu a caracterização de uma coleção recente de amostras de Klebsiellae em *K. pneumoniae* ou *K. variicola*, *K. oxytoca* e *R. planticola*;
2. A pesquisa BLASTn e o estudo filogenético resultantes da análise das seqüências do gene *rpoB* de amostras representativas de cada grupo caracterizado fenotipicamente reiteraram a classificação fenotípica observada e permitiram a separação entre *K. pneumoniae* e *K. variicola*. A espécie *K. variicola*, portanto, só pôde ser identificada genotipicamente;
3. Considerando-se amostras de *K. pneumoniae*, *K. variicola* e *K. oxytoca*, foram observadas elevadas taxas de resistência à maioria dos antimicrobianos testados, com a exceção do imipenem. O percentual de amostras produtoras de ESBL também se mostrou alto para estes grupos bacterianos. Apenas *R. planticola* foi resistente somente à ampicilina e não revelou produção de ESBL;
4. Os resultados da tipagem molecular através do ERIC2-PCR revelaram a diversidade genotípica de amostras de Klebsiellae.

PROPOSTA

No presente estudo, uma coleção recente de amostras humanas de Klebsiellae foi identificada usando um painel de 20 testes de identificação simples, incluindo quatro testes adicionais: crescimento a 10°C, fermentação de L-sorbose e assimilação de histamina e D-melezitose. Nossos resultados demonstraram que amostras de *K. pneumoniae* ou *K. variicola*, *K. oxytoca* e *R. planticola* puderam ser identificadas entre amostras de Klebsiellae usando estes métodos e, portanto, recomendamos esta proposta como rotina nos laboratórios de microbiologia clínica. Para os serviços que dispõem de sistemas miniaturizados ou automatizados de identificação, preconizamos a realização dos testes adicionais de crescimento a 10°C e assimilação de histamina e D-melezitose para a correta caracterização de amostras de Klebsiellae. Considerando-se amostras de *K. variicola*, são necessários estudos adicionais para o delineamento de um esquema fenotípico de identificação.

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

Babini, G.S. & Livermore, D.M. 2000. Are SHV β -lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? **Antimicrob. Agents Chemother.**, **44**:2230.

Behar, P.; Kader, I.T.A.; Sityá, L.; Scheidegger, E.M.D.; Teixeira, L.M. & Moreira, B.M. 2001. Extended spectrum β -lactamase (ESBL) detection in *Klebsiella pneumoniae* isolates in large hospitals in Porto Alegre, RS, Brazil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, XXI, 2001, Foz do Iguaçu – PR – Brasil. **Resumos**. Rio de Janeiro: Armazém das Letras Gráfica e Editora Ltda, p.141.

Ben-Hamouda, T.; Foulon, T.; Ben-Cheikh-Masmoudi, A.; Fendri, C.; Belhadj, O. & Bem-Mahrez. 2003. Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. **J. Med. Microbiol.**, **52**:427-33.

Biedenbach, D.J.; Moet, G.J. & Jones, R.N. 2004. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **50**:59-69.

Bonnet, R.; Sampaio, J.L.; Chanal, C.; Sirot, D.; De Champs, C.; Viillard, J.L.; Labia, R. & Sirot, J. 2000^a. A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **44**:3061-8.

Bonnet, R.; Sampaio, J.L.; Labia, R.; De Champs, C.; Sirot, D.; Chanal, C. & Sirot, J. 2000^b. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **44**:1936-42.

Bonnet, R.; Dutour, C.; Sampaio, J.L.; Chanal, C.; Sirot, D.; Labia, R.; De Champs, C. & Sirot, J. 2001. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240 to Gly. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **45**:2269-75.

Bosi, C.; Davin-Regli, A.; Bornet, C.; Mallea, M.; Pages, J.-M. & Bollet, C. 1999. Most *Enterobacter aerogenes* strains in France belong to a prevalent clone. **J. Clin. Microbiol.**, **37**:2165-9.

Boye, K. & Hansen, D.S. 2003. Sequencing of 16S rDNA of *Klebsiella*: taxonomic relations within the genus and to other *Enterobacteriaceae*. **Int. J. Med. Microbiol.**, **292**:495-503.

Bradford, P.A. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin. Microbiol. Rev.**, **14**:933-51.

Branger, C.; Lesimple, A.L.; Berry, P. & Lambert-Zechovsky, N. 1998. Long-term investigation of the clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases in a university hospital. **J. Med. Microbiol.**, **47**:201-9.

Brisse, S. & Duijkeren, E. 2005. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. **Vet. Microbiol.**, **105**:307-12.

Brisse, S.; Milatovic, D.; Fluit, A.C.; Verhoef, J. & Schmitz, F.J. 2000. Epidemiology of quinolone resistance of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in Europe. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **19**:64-8.

Brisse, S.; van Himbergen, T.; Kusters, K. & Verhoef, J. 2004. Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. **Clin. Microbiol. Infect.**, **10**:942-5.

Brisse, S. & Verhoef, J. 2001. 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.**, **51**:915-24.

Bush, K.; Jacoby, G.A. & Medeiros, A.A. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **39**:1211-33.

Cartelle, M., del Mar Tomas, M.; Pertega, S.; Beceiro, A.; Dominguez, M.A.; Velasco, D.; Molina, F.; Villanueva, R. & Bou, G. 2004. Risk factors for colonization and infection in a hospital outbreak caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins. **J. Clin. Microbiol.**, **42**:4242-9.

Carter, J.S.; Bowden, F.J.; Bastian, I.; Myers, G.M.; Sriprakash, K.S. & Kemp, D.J. 1999. Phylogenetic evidence for reclassification of *Calymmatobacterium granulomatis* as *Klebsiella granulomatis* comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **49**:1695-700.

Carter, J.; Hutton, S.; Sriprakash, K.S.; Kemp, D.J.; Lum, G.; Savage, J. & Bowden, F.J. 1997. Culture of the causative organism of donovanosis (*Calymmatobacterium granulomatis*) in Hep-2 cells. **J. Clin. Microbiol.**, **35**:2915-7.

Chaves, J.; Ladona, M.G.; Segura, C.; Coira, A.; Reig, R. & Ampurdanés, C. 2001. SHV-1 β -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **45**:2856-61.

Claeys, G.; De Baere, T.; Wauters, G.; Vandecandelaere, P.; Verschraegen, G.; Muylaert, A. & Vaneechoutte, M. 2004. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacter aerogenes* phenotypically misidentified as *Klebsiella pneumoniae* or *K. terrigena*. **BMC Microbiol.**, **4**:49.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2003. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Eighth Edition.** CLSI Document M2-A8.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement.** CLSI Document M100-S15.

Conceição, T.; Brízio, A.; Duarte, A. & Barros, R. 2005. First isolation of *bla*_{VIM-2} in *Klebsiella oxytoca* clinical isolates from Portugal. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **49**:476.

Dahllöf, I; Baillie, H. & Kjelleberg, S. 2000. *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. **Appl. Environ. Microbiol.**, **66**:3376-80.

Davin-Regli, A.; Monnet, D.; Saux, P.; Bosi, C.; Charrel, R.; Barthelemy, A. & Bollet, C. 1996. Molecular epidemiology of *Enterobacter aerogenes* acquisition: one-year prospective study in two intensive care units. **J. Clin. Microbiol.**, **34**:1474-80.

Drancourt, M.; Berger, P. & Raoult, D. 2004. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. **J. Clin. Microbiol.**, **42**:2197-202.

Drancourt, M.; Bollet, C.; Carta, A. & Rousselier, P. 2001. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, **51**:925-32.

Drancourt, M. & Raoult, D. 2005. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. **J. Clin. Microbiol.**, **43**:4311-5.

Decré, D.; Burghoffer, B.; Gautier, V.; Petit, J.C. & Arlet, G. 2004. Outbreak of multi-resistant *Klebsiella oxytoca* involving strains with extended-spectrum β -lactamases and strains with extended-spectrum activity of the chromosomal β -lactamase. **J. Antimicrob. Chemother.**, **54**:881-8.

Decré, D.; Gachot, B.; Lucet, J.C.; Arlet, G.; Bergogne-Bérézin, E. & Régnier, B. 1998. Clinical and bacteriologic epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a medical intensive care unit. **Clin. Infect. Dis.**, **27**:834-44.

Edwards, P.R. & Ewing, W.H. 1986. **Identification of *Enterobacteriaceae***. 4th ed., New York: Elsevier Science Publishing Co.

Euzéby, J. 2004. Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, **54**:631-2.

Farmer III, J.J.; Davis, B.R.; Hickman-Brenner, F.W.; McWhorter, A.; Huntley-Carter, G.P.; Asbury, M.A.; Riddle, C.; Wathen-Grady, H.G.; Elias, C.; Fanning, G.R.; Steigerwalt, A.G.; O'Hara, C.M.; Morris, G.K.; Smith, P.B. & Brenner, D.J. 1985. Biochemical identification of new species and biotypes of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, **21**:46-76.

Fevre, C.; Jbel, M.; Passet, V.; Weill, F.X.; Grimont, P.A.D. & Brisse, S. 2005^a. Six groups of the OXY β -lactamase evolved over millions of years in *Klebsiella oxytoca*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **49**:3453-62.

Fevre, C.; Passet, V.; Weill, F.X.; Grimont, P.A.D. & Brisse, S. 2005^b. Variants of the *Klebsiella pneumoniae* OKP chromosomal beta-lactamase are divided into two main groups OKP-A and OKP-B. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **49**:5149-52.

Fischer, R.; Penner, J.L.; Zurinaga, G.; Riddle, C.; Sämisch, W. & Brenner, D.J. 1989. Usefulness of trehalose fermentation and L-glutamic acid decarboxylation for identification of biochemically aberrant *Providencia stuartii* strains. **J. Clin. Microbiol.**, **27**:1969-72.

Fournier, B.; Roy, P.H.; Lagrange, P.H. & Philippon, A. 1996. Chromosomal β -lactamase genes of *Klebsiella oxytoca* are divided into two main groups, *bla*_{OXY-1} and *bla*_{OXY-2}. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **40**:454-9.

Gaillot, O.; Maruéjols, C.; Abachin, E.; Lecuru, F.; Arlet, G.; Simonet, M. & Berche, P. 1998. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum β -lactamase originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. **J. Clin. Microbiol.**, **36**:1357-60.

Gori, A.; Espinasse, F.; Deplano, A.; Nonhoff, C.; Nicolas, M.H. & Struelens, M.J. 1996. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified DNA polymorphism analysis for typing extended-spectrum β -lactamase – producing *Klebsiella pneumoniae*. **J. Clin. Microbiol.**, **34**:2448-53.

Granier, S.A.; Leflon-Guibout, V.; Goldstein, F.W. & Nicolas-Chanoine, M.H. 2003. Enterobacterial repetitive intergenic consensus 1R PCR assay for detection of *Raoultella* sp. isolates among strains identified as *Klebsiella oxytoca* in the clinical laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, **41**:1740-42.

Granier, S.A.; Plaisance, L.; Leflon-Guibout, V.; Lagier, E.; Morand, S.; Goldstein, F.W. & Nicolas-Chanoine, M.H. 2003. Recognition of two genetic groups in the *Klebsiella oxytoca* on the basis of chromosomal β -lactamase and housekeeping gene sequences as well as ERIC-1R PCR typing. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, **53**:661-8.

Haeggman, S.; Löfdahl, S. & Burman, L.G. 1997. An allelic variant of the chromosomal gene for class A β -lactamase K2, specific for *Klebsiella pneumoniae*, is the ancestor of SHV-1. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **41**:2705-9.

Haeggman, S.; Löfdahl, S.; Paauw, A.; Verhoef, J. & Brisse, S. 2004. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **48**:2400-8.

Hansen, D.S.; Aucken, H.M.; Abiola, T. & Podschun, R. 2004. Recommended test panel for differentiation of *Klebsiella* species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests. **J. Clin. Microbiol.**, **42**:3665-9.

Hansen, D.S.; Gottschau, A. & Kolmos, H.J. 1998. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. **J. Hosp. Infect.**, **38**:119-32.

Hashimoto, J.G.; Stevenson, B.S. & Schmidt, T.M. 2003. Rates and consequences of recombination between rRNA operons. **J. Bacteriol.**, **185**:966-72.

Hill, C.W. & Harnish, B.W. 1981. Inversions between ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **78**:7069-72.

Hollander, R.; Ebke, M.; Barck, H. & Pritzbuer, E.V. 2001. Asymptomatic carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase by patients in a neurological early rehabilitation unit: management of an outbreak. **J. Hosp. Infect.**, **48**:207-13.

Holmes, B. & Aucken, H.M. 1998. *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* and other members of the *Enterobacteriaceae*. In: Balows, A. & Duerden, B.I. **Systematic Bacteriology**. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9th ed., London: Arnold/Holder Headline Group, p.999-1033.

Kwon, S.W.; Go, S.J.; Kang, H.W.; Ryu, J.C. & Jo, J.K. 1997. Phylogenetic analysis of *Erwinia* species based on 16S rRNA gene sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **47**:1061-7.

Li, X.; Zhang, D.; Chen, F.; Ma, J.; Dong, Y. & Zhang, L. 2004. *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, **54**:2131-6.

Lincopan, N.; McCulloch, J.A.; Reinert, C.; Cassettari, V.C.; Gales, A.C. & Mamizuka, E.M. 2005. First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, **43**:516-9.

Liu, P.Y.F.; Lau, Y.J.; Hu, B.S.; Shyr, J.M.; Shi, Z.Y.; Tsai, W.S.; Lin, Y.H. & Tseng, C.Y. 1995. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. **J. Clin. Microbiol.**, **33**:1779-83.

Liu, Y.; Mee, B. J. & Mulgrave, L. 1997. Identification of clinical isolates of indole-positive *Klebsiella* spp., including *Klebsiella planticola*, and a genetic and molecular analysis of their beta-lactamases. **J. Clin. Microbiol.**, **35**:2365-9.

Livermore, D.M. 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, **8**:557-84.

Livermore, D. M. & Woodford, N. 2000. Carbapenemases: a problem in waiting? **Curr. Opin. Microbiol.**, **3**:489-95.

Loureiro, M.M.; Moraes, B.A.; Mendonça, V.L.F.; Quadra, M.R.R.; Pinheiro, G.S. & Asensi, M.D. 2001. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from neonatal intensive care unit patients involved in hospital infection cases in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, **43**:88-95.

Mac Faddin, J.F. 1976. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 312p.

Manges, A.R.; Johnson, J.R.; Foxman, B.; O'Bryan, T.T.; Fullerton, K.E. & Riley, L.W. 2001. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. **New Engl. J. Med.**, **345**:1007-13.

Martínez, J.; Martínez, L.; Rosenblueth, M.; Silva, J. & Martínez-Romero, E. 2004. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **Int. Microbiol.**, **7**:261-8.

Martins, I.S. 2001. **Aquisição de *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamase de espectro estendido em pacientes admitidos no centro de terapia intensiva de um hospital universitário do Rio de Janeiro**. 2001. 98 p. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Rio de Janeiro.

Meacham, K.J.; Zhang, L.; Foxman, B.; Bauer, R.J. & Marrs, C.F. 2003. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. **J. Clin. Microbiol.**, **41**:5224-6.

Medeiros, A.A. 1997. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. **Clin. Infect. Dis.**, **24**:S19-45.

Mollet, C.; Drancourt, M. & Raoult, D. 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. **Mol. Microbiol.**, **26**:1005-11.

Monnet, D.; Freney, J.; Brun, Y.; Boeufgras, J.-M. & Fleurette, J. 1991. Difficulties in identifying *Klebsiella* strains of clinical origin. **Zentralbl. Bakteriol.**, **274**:456-64.

Monnet, D. & Freney, J. 1994. Method for differentiating *Klebsiella planticola* and *Klebsiella terrigena* from other *Klebsiella* species. **J. Clin. Microbiol.**, **32**:1121-2.

Monnet, D.L.; Biddle, J.W.; Edwards, J.R.; Culver, D.H.; Tolson, J.S.; Martone, W.J.; Tenover, F.C. & Gaynes, R.P. 1997. Evidence of interhospital transmission of extended-spectrum β -lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States, 1986 to 1993. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **18**:492-8.

Mori, M.; Ohta, M.; Agata, N.; Kido, N.; Arakawa, Y.; Ito, H.; Komatsu, T. & Kato, N. 1989. Identification of species and capsular types of *Klebsiella* clinical isolates, with special reference to *Klebsiella planticola*. **Microbiol. Immunol.**, **33**:887-895.

Oliveira, S.M.; Fernandes, M.J.B.C. & Almeida, D. 2001. Extended spectrum β -lactamase produced by *Klebsiella spp* from neonatal intensive care unit - a preliminary study. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, XXI, 2001, Foz do Iguaçu - PR - Brasil. **Resumos**. Rio de Janeiro: Armazém das Letras Gráfica e Editora Ltda, p.150.

Ørskov, I. 1984. Genus V. *Klebsiella* Trevisan 1885, 105^{AL}. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 8th ed, vol 1. Baltimore: Williams & Wilkins, p.461-5.

Palucha, A.; Mikiewicz, B.; Hryniewicz, W. & Gniadkowski, M. 1999. Concurrent outbreaks of extended-spectrum β -lactamase-producing organisms of the family *Enterobacteriaceae* in a Warsaw hospital. **J. Antimicrob. Chemother.**, **44**:489-99.

Pellegrino, F.L.P.C.; Teixeira, L.M.; Carvalho, M.G.S.; Nouér, S.A.; Oliveira, M.P.; Sampaio, J.L.M.; Freitas, A.D.; Ferreira, A.L.P.; Amorim, E.L.T.; Riley, L.W. & Moreira, B.M. 2002. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, **40**:2420-4.

Pessoa-Silva, C.L.; Toscano, C.M.; Moreira, B.M.; Santos, A.L.; Frota, A.C.; Solari, C.A.; Amorim, E.L.; Carvalho, Mda G.; Teixeira, L.M. & Jarvis, W.R. 2002. Infection due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Infantis in a neonatal unit. **J. Pediatr.**, **141**:381-7.

Podschun, R. & Ullmann, U. 1992. Isolation of *Klebsiella terrigena* from clinical specimens. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **11**:349-52.

Podschun, R.; Acktun, H.; Okpara, J.; Linderkamp, O.; Ullmann, U. & Borneff-Lipp, M. 1998. Isolation of *Klebsiella planticola* from newborns in a neonatal ward. **J. Clin. Microbiol.**, **36**:2331-2.

Podschun, R. & Ullmann, U. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, **11**:589,603.

Pruckler, J.M.; Mermel, L.A.; Benson, R.F.; Giorgio, C.; Cassidy, P.K.; Breiman, R.F.; Whitney, C.G. & Fields, B.S. 1995. Comparison of *Legionella pneumophila* isolates by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis: analysis from seven epidemic investigations. **J. Clin. Microbiol.**, **33**:2872-5.

Qi, Y.; Patra, G.; Liang, X.; Williams, L.E.; Rose, S.; Redkar, R.J. & Del Vecchio, V.G. 2001. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **67**:3720-7.

Ribas, R.M.; Brito, D.V.D.; Freitas, C.; Urzedo, J.E. & Gontijo Filho, P.P. 2001. Fatores de risco e fenótipos de resistência de bactérias Gram negativas associadas à bacteremias hospitalares e comunitárias no HU-UFU. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, XXI, 2001, Foz do Iguaçu - PR - Brasil. **Resumos**. Rio de Janeiro: Armazém das Letras Gráfica e Editora Ltda, p.142.

Rosenblueth, M.; Martínez, L.; Silva, J. & Martínez-Romero, E. 2004. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. **Syst. Appl. Microbiol.**, **27**:27-35.

Sader, H.S. 2000. Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies. **Braz. J. Infec. Dis.**, **4**:91-9.

Sader, H.S.; Jones, R.N.; Gales, A.C.; Silva, J.B.; Pignatari, A.C. & the SENTRY Participants Group (Latin America). 2004. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **Braz. J. Infec. Dis.**, **8**:25-79.

Sharples, J.G. & Lloyd, G.D. 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. **Nucl. Acids Res.**, **18**:6503-8.

Spröer, C.; Mendrock, U.; Swiderski, J.; Lang, E. & Stackebrandt, E. 1999. The phylogenetic position of *Serratia*, *Buttiauxella* and some other genera of the family *Enterobacteriaceae*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **49**:1433-8.

Stock, I. & Wiedemann, B. 2001. Natural antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* and *K. terrigena* strains. **J. Med. Microbiol.**, **50**:396-406.

Tenover, F.C.; Arbeit, R.D. & Goering, R.V. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **18**:426-39.

Versalovic, J.; Koeuth, T. & Lupski, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes. **Nucl. Acids Res.**, **19**:6823-31.

Vidotti, C.C.F. 2000. Erros de uso de medicamentos: uma nova abordagem preventiva para um problema freqüente. **Pharm. Bras.**, **21**:51-2.

Walckenaer, E.; Poirel, L.; Leflon-Guibout, V.; Nordmann, P. & Nicolas-Chanoine, M.H. 2004. Genetic and biochemical characterization of the chromosomal class A β -lactamases of *Raoultella* (formerly *Klebsiella*) *planticola* and *Raoultella ornithinolytica*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **48**:305-12.

Watanakunakorn, C. & Jura, J. 1991. *Klebsiella* bacteremia: a review of 196 episodes during a decade (1980-1989). **Scand. J. Infect. Dis.**, **23**:399-405.

Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A. & Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol.**, **173**:697-703.

Westbrook, G.L.; O'Hara, C.M.; Roman, S.B. & Miller, J.M. 2000. Incidence and identification of *Klebsiella planticola* in clinical isolates with emphasis on newborns. **J. Clin. Microbiol.**, **38**:1495-7.

Winn Jr., W.C.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Koneman, E.W.; Procop, G.; Schreckenberger, P.C. & Woods, G.L. 2006. **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6th ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1535 p.

ANEXOS – PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

Artigo 1: Identification of Clinical Isolates of Indole-Positive and Indole-Negative *Klebsiella* spp. – publicado no *Journal of Clinical Microbiology*, **44**:3640-3646, 2006.

Artigo 2: A case of severe pancreatitis complicated by *Raoultella planticola* infection – submetido no *Journal of Medical Microbiology*.

Artigo 1:

Identification of Clinical Isolates of Indole-Positive and Indole-Negative *Klebsiella* spp.

Running title: Identification of *Klebsiella* spp. Clinical Isolates

Maria Silvana Alves^{1,2}, Rubens Clayton da Silva Dias², Angela Christina Dias de Castro², Lee W. Riley³, and Beatriz Meurer Moreira^{2*}

Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG,¹ and Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ,² Brazil, and School of Public Health, University of California, Berkeley, California³

This work was performed at:

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Bloco I
Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil and School of Public Health,
University of California, Berkeley, 140 Warren Hall, Berkeley, CA, 94720, USA

* Corresponding author:

Beatriz Meurer Moreira

Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde, Bloco I

Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-590

Brazil

Phone: 55-21-25626745. Fax: 55-21-22608344

E-mail: bmeurer@micro.ufrj.br

Abstract

Biochemical methods employed to classify bacterial species have limitations, and may have contributed to the taxonomic complexity recently reported for the genus *Klebsiella*. The objective of the present study was to apply a simple biochemical test panel to classify a collection of human *Klebsiellae* isolates. We found that with only three additional tests, it is possible to place most isolates into a defined species. Analysis of 512 bp sequence of the *rpoB* gene was used as the reference. A total of 16 conventional and 4 supplementary tests were used to evaluate 122 recent isolates identified as *Klebsiellae* from 120 patients isolated at the clinical laboratory of a university hospital in Minas Gerais, Brazil. Of these, 102 (84%) isolates were identified as *Klebsiella pneumoniae* or *Klebsiella variicola* (Kp/Kv), 19 (15%) as *Klebsiella oxytoca*, and one (1%) as *Raoultella planticola*. ERIC-PCR typing revealed a diversity of genotypes. *rpoB* gene sequencing confirmed the phenotypic identification and detected five *K. variicola* isolates among Kp/Kv. Three additional tests that include growth at 10°C, and histamine and D-melezitose assimilation should be considered as essential tests for the typification of *Klebsiellae* isolates.

Introduction

Klebsiellae are opportunistic human pathogens that can be isolated from various animal and human clinical specimens (39). Between 1997 and 2002, these organisms were responsible for 7-10% of all hospital associated bloodstream infections in Europe, Latin America and North America, as reported by the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (3). Antimicrobial resistance represents a serious problem in this bacterial group,

especially due to the increasing prevalence of extended-spectrum β -lactamase producing isolates (ESBL) (12, 13, 27, 29, 30, 39, 43).

The phylogenetic structure of the genus *Klebsiella* has been recently reanalyzed (4, 6, 8, 14, 40), and all recent studies have shown a taxonomic complexity of this organism. Accordingly, by sequencing the 16S rRNA and *phoE* genes, *Calymmatobacterium granulomatis* was renamed *Klebsiella granulomatis* (8); based on 16S rRNA and *rpoB* sequence analysis, the new genus *Raoultella* was proposed to accommodate *Klebsiella planticola*, *Klebsiella terrigena* and *Klebsiella ornithinolytica* (14); two new *Klebsiella* species were described: *Klebsiella variicola*, derived from analysis of *rpoB*, *gyrA*, *mdh*, *infB*, *phoE* and *nifH* sequences (40) and *Klebsiella singaporensis*, based on 16S rRNA and *rpoB* gene sequences (26); and finally, 16S rRNA sequences for two proposed species, *Klebsiella milletis* and *Klebsiella senegalensis* were deposited in the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.gov.br>) (2003), but no description of these data has been published to date.

Subgroups within species were also determined. Based on nucleotide variations of the *gyrA*, *parC* and *rpoB* genes, clinical isolates of *K. pneumoniae* fall into four phylogenetic groups named KpI, KpII-A, KpII-B, and KpIII (6, 7, 18), with the newly described species *K. variicola* appearing to correspond to KpIII (40). In addition, *Klebsiella oxytoca* has been shown to include five distinct phylogenetic lines (KoI, KoII, KoIII, KoIV and KoVI) which can be identified by 16S rDNA, *rpoB*, *gyrA*, *gapDH* and *bla_{OXY}* gene sequencing (19).

The correct identification of *Klebsiellae* species is not easily accomplished in most clinical microbiology laboratories because several species share a similar biochemical profile. Studies have shown that a proportion of isolates classified as *K. pneumoniae* could

in fact be *Raoultella planticola* (34, 45), *Raoultella terrigena* (34, 38) or *K. variicola* (5, 40), and some of the isolates classified as *K. oxytoca* actually could be *R. planticola* (34, 45). Even so, most clinical isolates classified as Klebsiellae belong to *K. pneumoniae* (indole negative isolates) and *K. oxytoca* species (indole positive isolates) (23, 28, 39, 44). However, *K. variicola*, *R. planticola* and *R. terrigena* can show a negative-indole reaction, in addition to *K. pneumoniae* (5, 33, 34, 40, 45). On the other hand, *R. planticola* can reveal a positive-indole reaction, in addition to *K. oxytoca* (34, 45). Most test kits and automated methods do not yet include many of these organisms in their identification databases, nor the substrates that would differentiate them (45). For example, *K. singaporensis* may be recognized by the ability to grow at 10°C, being positive by the Voges-Proskauer test, and having negative indole production and L-sorbose fermentation. However, to date, only one isolate of this species has been found, obtained from soil (26).

Several groups of biochemical tests have been proposed to allow differentiation among some of the most common Klebsiellae species. A scheme was proposed by Monnet and Freney in 1994 (33), and included four carbon substrate assimilation tests: ethanolamine, histamine, D-melezitose, and DL-3-hydroxybutyrate, in addition to indole production and ornithine decarboxylation. All *Raoultella* isolates tested in this study were histamine and DL-3-hydroxybutyrate positive, and ethanolamine and D-melezitose negative, with the exception for *R. terrigena*, which revealed a positive D-melezitose test (33). The limitation of this scheme is that the authors used five different combinations of the API system for preliminary identification, a procedure unfeasible in the routine work of most clinical microbiology laboratories. Another important test was proposed by Drancourt and collaborators: ability to grow at 10°C would be a hallmark of the genus *Raoultella*, while all species of *Klebsiella*, with the exception of *K. oxytoca*, would not grow at this

temperature (14). Rosenblueth and collaborators found that the inability to ferment adonitol could be characteristic of *K. variicola*, while most *K. pneumoniae* strains were able to ferment this carbohydrate (40). However, Brisse and collaborators (2004) reported later that KpI, KpII and KpIII are adonitol variable (7), putting into question the usefulness of adonitol fermentation as a differential test. Finally, in 2004, Hansen and collaborators (24) proposed a test panel consisting of 18 biochemical tests to differentiate Klebsiellae species. However, no reference taxonomic methods were employed by those authors to validate their proposal.

The development of methods for rapid routine differentiation of Klebsiellae isolates in clinical microbiology laboratories is necessary to clarify whether or not significant epidemiological or pathogenic differences exist between the *Klebsiella* species (28). According to Brisse and Verhoef (2001) (6), the association between genetic variability and virulence and transmissibility of *Klebsiella* strains is not well understood, but there is clear evidence for varied behavior of this bacterial group. In addition, unlike community outbreaks, typing of organisms in hospital outbreaks may be essential to identifying chains of transmission because of the ubiquitous nature of microorganisms in the hospital environment.

The objective of the present study was to apply a simple biochemical test panel to identify a recent collection of human Klebsiellae isolates, and propose that with only three additional tests, it is possible to place most isolates into a defined species. We used the analysis of the *rpoB* gene sequence as the reference method for the final identification of isolates to species level.

Material and methods

Bacterial isolates. From March 2002 to March 2004, 122 clinical Klebsiellae isolates were sequentially recovered from 120 patients (58 inpatients and 62 outpatients) from Hospital Universitário of Universidade Federal de Juiz de Fora, in the state of Minas Gerais, southwest region of Brazil. Only one isolate per patient was included in this study, except for two patients who had one *K. pneumoniae* and one *K. oxytoca* isolate each. In addition, two isolates classified as *R. planticola* obtained from the same patient were included, but only for the analysis of the *rpoB* gene sequence. Isolates were obtained from urine (86 isolates, 71%), blood (15, 12%), various secretions (12, 10%), catheter tip (4, 3%), peritoneal fluid (3, 2%) and other sites (2, 2%). Reference strains included *Escherichia coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *R. planticola* ATCC 33531, *R. terrigena* ATCC 33257, and one *K. oxytoca* isolate previously characterized in our laboratory (*K. oxytoca* AP). All bacterial isolates were grown on MacConkey agar and stored as suspensions in a 10% (wt/vol) skim milk solution containing 10% (vol/vol) glycerol at -20°C for later analysis.

Biochemical methods. All bacterial isolates were identified as Klebsiellae in the clinical laboratory by non-automated biochemical tests. All isolates were reevaluated in 16 well-established biochemical tests for *Enterobacteriaceae* (17) and four supplementary tests selected from those recommended by references 14, 24, and 33. Initial tests followed the protocols suggested by MacFaddin (31), and included oxidase test; glucose and lactose or sucrose fermentation, gas and H₂S production in triple sugar iron (TSI) agar; motility and indole production in sulfide indole motility (SIM) medium; citrate and malonate utilization; arginine, lysine and ornithine decarboxylation; phenylalanine deamination;

urease production; adonitol fermentation, and methyl red (MR) and Voges-Proskauer (VP) tests. Supplementary tests included growth at 10°C and L-sorbose fermentation (16) and histamine and D-melezitose assimilation (33). Carbohydrates were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. Bacterial inoculum was prepared as 0.5 McFarland standard turbidity suspensions obtained from cells grown in solid media; 10 µl aliquots were used for growth at 10°C, adonitol and L-sorbose tests, and 100 µl aliquots were used for histamine and D-melezitose tests. Incubation times were 2 days for the histamine and D-melezitose assimilation tests, 3 days for growth at 10°C, and up to 7 days for L-sorbose and adonitol tests. Incubation temperature was 35°C, except for histamine and D-melezitose (30°C) and growth at 10°C. Bromothymol blue pH-indicator was used for adonitol test (20) and Andrade's indicator for L-sorbose test (16). For one isolate (K124) with a profile suggestive of *K. oxytoca* that was repetitively indole-negative in SIM medium, indole production was evaluated by dropping Kovac's reagent over colonies grown overnight on Fluorocult® ECD-Agar (Diagnostica Merck, Darmstadt, Germany).

Sequence analysis of the *rpoB* gene. A total of 47 isolates (30 putative *K. pneumoniae*/*K. variicola*, 15 putative *K. oxytoca*, and two putative *R. planticola*) were included in the analysis of *rpoB*. DNA was extracted by thermal lysis (36) and ~ 1,000 bp fragments of the *rpoB* gene were PCR-amplified with oligonucleotide primers CM₇ (5'-AACCAGTTCGCGTTGGCCTGG-3') and CM_{31b} (5'-CCTGAACAACACGCTCGGA-3') (14). Amplicons were purified with QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) and DNA sequencing of both strands was carried out at the DNA Sequencing Facility of the University of California, Berkeley, California, USA. Fragments of 512 bp overlapping sequences were analyzed by BLASTn

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) to confirm the identity of the isolates, and then aligned by ClustalW Multiple Alignment of BioEdit Sequence Alignment Editor, version 7.0.4.1. The alignment data were assessed by bootstrap analyses based on 1000 resamplings. Aligned sequences were examined for molecular evolutionary relationships by the neighbor-joining distance method with the Jukes & Cantor parameter model. A phylogenetic tree was obtained by TREECON for Windows version 1.3b (University of Konstanz). The significance of the branching order was evaluated by bootstrap analysis with 100 replicates. The *rpoB* sequences of the following strains were obtained from GenBank database and included in the phylogenetic analysis: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 13883 (accession # U77444), *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* ATCC 11296 (accession # AF129445), *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* ATCC 13884 (accession # AF129446), *K. oxytoca* ATCC 13182 (accession # U77442), *K. variicola* ATCC BAA-830 (accession # AY367356), *R. planticola* ATCC 33531 (accession # AF129449), *R. terrigena* ATCC 33257 (accession # AF129448), *Raoultella ornithinolytica* ATCC 31898 (accession # AF129447), and *Staphylococcus sciuri* subsp. *carniticus* ATCC 700058 (accession # DQ120748), as outgroup. *K. granulomatis* and *K. singaporensis* were not included in the phylogenetic analysis because isolates of these species cannot be cultured on conventional media (9) or are not obtained from human clinical specimens (26).

Antimicrobial susceptibility testing and ESBL detection. Bacterial susceptibility was determined by disk diffusion in accordance with CLSI guidelines (10, 11) for the following agents: amikacin, amoxicillin-clavulanate, ampicillin, aztreonam, cefepime, cefotaxime, cefoxitin, ceftazidime, cephalothin, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem and trimethoprim-sulfamethoxazole. ESBL production was determined by the combination of oximino-cephalosporins and clavulanate (10, 11).

Strain typing by ERIC2-PCR. DNA was extracted by thermal lysis (36). PCR reactions were prepared in a total volume of 25 μ L, containing 3 mM MgCl₂, 0.3 μ M of ERIC2 primer and 3 μ L of bacterial DNA. Amplification conditions were 94°C for 2 min; 40 cycles of 94°C for 30 s, 54°C for 1 min, and 72°C for 4 min; and a final step at 72°C for 1 min (36). Banding profiles were analyzed by GelComparII, version 3.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) by the Dice index and the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA).

GenBank access numbers. *rpoB* gene sequences analyzed are deposited under numbers DQ415473-DQ415498 (*K. pneumoniae*), DQ415458-DQ415472 (*K. oxytoca*), DQ415499-DQ415503 (*K. variicola*), and DQ415504 - DQ415505 (*R. planticola*).

Results

Biochemical identification. All 122 clinical isolates, but one, formed typical red colonies indicating fermentation of lactose and acid production on MacConkey agar. All these isolates were oxidase, H₂S, arginine, ornithine and phenylalanine negative, glucose fermenters, citrate positive, non-motile typical Gram-negative bacilli. Therefore, all were confirmed as belonging to the genus *Klebsiella* or *Raoultella*. A total of 102 (84%) of the 122 isolates were negative for indole production, unable to assimilate histamine and D-melezitose or to grow at 10°C. All these 102 isolates were identified as possible *K. pneumoniae*/*K. variicola*, as shown in Table 1. Of the total, 25 isolates (25%) showed from one to three variations in other biochemical tests. Other 19 isolates (15%) were positive for indole and urease production, L-sorbose fermentation, lysine decarboxylation, VP test, and growth at 10°C, and negative for histamine assimilation. They were identified as possible

K. oxytoca (Table 1). Finally, one isolate (1%) was positive for indole production, histamine assimilation, growth at 10°C, and negative for ornithine and D-melezitose. This isolate was identified as possible *R. planticola*. No isolates corresponding to *K. singaporensis*, *R. ornithinolytica* or *R. terrigena* species were identified in the present study.

***rpoB* gene sequences and phylogenetic analysis.** Among 30 possible *K. pneumoniae*/*K. variicola* isolates sequenced, the BLASTn search revealed, for 25 isolates, 98%-100% *rpoB* sequence similarity to known *K. pneumoniae* strains, and for the other five isolates, 99-100% similarity to known *K. variicola* strains, including the type strain *K. variicola* ATCC BAA-830. The *K. variicola* strains were obtained from urine (3), catheter tip (one), and wound (one). The results for adonitol fermentation (40), the only test proposed to date to differentiate *K. pneumoniae* (positive) from *K. variicola* (negative), revealed that the 25 *K. pneumoniae* isolates included 22 positive and three negative ones, and the five *K. variicola* isolates included four negative and one positive isolate. Likewise, the *rpoB* sequences of 15 putative *K. oxytoca* isolates exhibited 98-100% similarity to known *K. oxytoca* strains, including the type strain *K. oxytoca* ATCC 13182. Finally, the two putative *R. planticola* isolates (K111 e K112) exhibited 98% *rpoB* sequence similarity to known *R. planticola* strains, including the type strain *R. planticola* ATCC 33531.

Phylogenetic analysis of *rpoB* gene sequences demonstrated the separation of possible species into four distinct clusters we named Kp, Kv, Rp/Ro and Ko (Figure 1). Cluster Kp included the sequences of 25 *K. pneumoniae* and strains *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 13883, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* ATCC 11296 and *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* ATCC 13884; cluster Kv included the sequences of the five *K. variicola* and strain *K. variicola* ATCC BAA-830; cluster Rp/Ro included the *R.*

planticola isolates and strains *R. planticola* ATCC 33531 and *R. ornithinolytica* ATCC 31898; and, finally, cluster Ko included all but one (K82) *K. oxytoca* isolates and strain *K. oxytoca* ATCC 13182. Isolate K82 showed a biochemical profile compatible to *K. oxytoca*, with one test variation (malonate negative). The BLASTn search revealed an *rpoB* sequence similarity of 99% between this isolate and *K. oxytoca* strain SG266 (accession # AJ871806). In conclusion, *rpoB* sequencing validated the phenotypic results, but *K. variicola* was not separated from *K. pneumoniae* by the biochemical tests. Table 2 summarizes test results that could separate Klebsiellae species.

To discriminate phylogenetic groups within *K. pneumoniae/K. variicola* and *K. oxytoca* strains, we obtained new trees (data not shown) that included the *rpoB* sequences analyzed by Fevre and collaborators (18, 19) (GenBank accession numbers AM051162 to AM051186 and AJ871801 to AJ871818). Clusters obtained in these trees are indicated in Figure 1. Of all subgroups described, only KpII-A and KoIII were not found within our study collection. Of note, KpI subgroup comprised 22 (73%) of the 30 Kp/Kv isolates sequenced. KpIII subgroup included all five *K. variicola* isolates. Considering the five Ko genetic groups described by Fevre and collaborators (19), in our collection we observed that 9 isolates (60% of the 15 isolates sequenced), together with the *K. oxytoca* ATCC 13182 strain, belong to KoII group, and a few other isolates belong to groups KoI, KoVI, and KoIV.

Antimicrobial susceptibility testing and extended spectrum β -lactamase production. Antimicrobial resistance rates among *K. pneumoniae/K. variicola* and *K. oxytoca* isolates are described in Table 3. All isolates were resistant to ampicillin, and susceptible to imipenem. Trimethoprim-sulfamethoxazole and cephalotin resistance rates were very high (more than 30%) for both bacterial groups. ESBL production was observed

in 28% (29 of 102) of the *K. pneumoniae*/*K. variicola* isolates, and 47% (9 of 19) of the *K. oxytoca* isolates. The *R. planticola* isolate was resistant only to ampicillin and did not reveal ESBL production.

ERIC-PCR typing. We typed 94 Klebsiellae isolates: 73 *K. pneumoniae*/*K. variicola*, including all 29 ESBL producing and the five *K. variicola* isolates; 19 *K. oxytoca*, and the two *R. planticola* isolates. Three type strains (*K. pneumoniae* ATCC 700603, *R. planticola* ATCC 33531, and *R. terrigena* ATCC 33257) and one strain previously characterized in our laboratory (*K. oxytoca* AP) were also analyzed. Strain *R. planticola* ATCC 33531 was included as a control in each amplification. Each isolate presented 4-12 bands, ranging from 200 to 5,000 bp. Among Kp/Kv isolates, one cluster was observed with two (K62 and K65) isolates. Each one of the isolates with a final identification of *K. variicola* presented a different profile. Among the *K. oxytoca* isolates, only one cluster of two isolates (K43 and K56) was observed. The two *R. planticola* isolates presented identical profiles (not shown).

Discussion

Klebsiellae species are difficult to identify and are often misclassified in clinical microbiology laboratories (24, 33, 34, 38, 45). However, the correct identification of Klebsiellae isolates is important for improved taxonomic and molecular epidemiologic characterization of this bacterial group.

In the present study, we characterized a collection of 122 recent Klebsiellae isolates with a panel of 20 biochemical tests, including four supplementary tests not routinely used in the identification of enterobacterial isolates: growth at 10°C, L-sorbose fermentation, and

histamine and D-melezitose assimilation. Phenotypic results were compared with *rpoB* sequencing. *K. pneumoniae*/*K. variicola*, *K. oxytoca*, and *R. planticola* were easily and accurately identified. However, the *K. pneumoniae*/*K. variicola* isolates could be differentiated in *K. pneumoniae* or *K. variicola* species only by genotyping. The isolate classified as *R. planticola*, originally identified as *K. oxytoca* had positive histamine, and negative ornithine and D-melezitose tests (33). Based on the results of the present study and those obtained by others (14, 33, 24), we propose that three supplemental tests: growth at 10°C, and histamine and D-melezitose assimilation, should be routinely used in the identification of Klebsiellae isolates, as summarized in Table 2. Our results demonstrated that the L-sorbose fermentation test was not essential for the correct identification of Klebsiellae isolates at the species level. The same observation was earlier performed by Hansen and collaborators (24). We agree with those authors that if the number of tests is to be reduced, L-sorbose could be omitted.

According to Rosenblueth and collaborators (40), *K. variicola* isolates do not ferment adonitol, a general characteristic of *K. pneumoniae* strains. In agreement, some *K. pneumoniae* isolates can be adonitol negative (17, 46) but *K. variicola* (or KpIII isolates) can be adonitol positive (7). Therefore, it does not seem possible to identify *K. variicola* based only on a negative adonitol test result. In the present study, of the five isolates that clustered with *K. variicola* ATCC BAA-830, four were adonitol negative but one was positive. On the other hand, among 25 *K. pneumoniae* isolates confirmed by *rpoB* gene sequencing, three (12%) tested adonitol negative. Currently, *K. variicola* is distinguished from *K. pneumoniae* and other Klebsiellae species only by *rpoB*, *gyrA*, *mdh*, *phoE*, *infB* and *nifH* gene sequencing or by low levels of DNA hybridization with other species (40).

K. pneumoniae/*K. variicola* were the most common isolates (102, 84%) followed by *K. oxytoca* (19, 15%), and *R. planticola* (one isolate, 1%). The relative frequencies of isolation of *K. pneumoniae*/*K. variicola* and *K. oxytoca* in our population are in agreement with those described by other authors (22, 44). However, the relative frequency of *R. planticola* isolation is much lower than that reported by Monnet and collaborators in France (8% of 204 isolates obtained from cardiology and neurology hospitals) (34), by Mori and collaborators in Japan (19% of 439 isolates from the Central Laboratories, Nagoya University Hospital, and several regional general hospitals) (35), and by Podschun and collaborators in Germany (9% of 131 isolates from a Pediatric Clinic, University of Heidelberg) (37). A small percentage of *R. planticola* as we observed was also detected by Westbrook and collaborators in the United States: 0.4% of a collection of 352 stock isolates from Centers for Disease Control and Prevention, including 43 stock isolates of *K. oxytoca* obtained from newborns, and 84 fresh clinical isolates randomly collected from four hospital laboratories in Atlanta (45).

The *rpoB* gene, which encodes for the bacterial RNA polymerase β -subunit, has been used as a signature for bacterial identification and as a *locus* for phylogenetic analysis (32). In 2005, Drancourt and Raoult proposed that bacterial isolates with less than 97% similarities in the 16S rRNA genes or *rpoB* gene sequences belong to different species (15). In the present study, the BLASTn search revealed *rpoB* sequence similarities greater than 98% for the classification suggested by the biochemical profiles. Therefore, *rpoB* sequencing confirmed the biochemical identification for all 47 isolates analyzed: 25 *K. pneumoniae*, 5 *K. variicola*, 15 *K. oxytoca*, and 2 *R. planticola*. It is noteworthy that only a genotypic method was able to separate *K. variicola* from *K. pneumoniae*. In previous

studies, *K. variicola* (KpIII) has not been observed in urinary tract infections (7). In our collection, three of the five *K. variicola* isolates were obtained from urine.

The proposed classification was supported by BLASTn high similarities. In addition, the phylogenetic tree with all sequences obtained allowed for the separation of *K. pneumoniae*, *K. variicola*, *K. oxytoca*, and *R. planticola* in clearly defined clusters sustained by moderate bootstrap values. These values are in the range of those previously reported by analysis of 16S rDNA gene for *Enterobacteriaceae* (14, 25, 42), and *rpoB* gene for *Klebsiellae* (14, 18, 40).

In the present collection, 22 (73%) *K. pneumoniae* isolates clustered with KpI, 3 (10%) with KpII-A and 5 (17%) with KpIII. A predominance of KpI isolates was also found by Brisse and collaborators (7). Isolates we determined as *K. variicola* in the present study were clustered together with the *K. variicola* ATCC BAA-830 strain and also with KpIII strain SB1. Therefore, it supports that KpIII corresponds to *K. variicola* as reported by Rosenblueth et al (40). *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* and *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* appear to be closely related to *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* on the tree (Kp group), in agreement with earlier reports (4, 6, 14).

Fevre and collaborators (19) have recently revised the phylogenetic tree organization of *K. oxytoca*. In the tree obtained with the sequences analyzed by these authors, isolate K82, that did not group with other *K. oxytoca* isolates in our first tree, was shown to belong to KoIV group.

The phylogenetic tree included type strain *R. ornithinolytica* ATCC 31898 into cluster Rp/Ro with the two *R. planticola* isolates of the present study (K11 and K112) and type strain *R. planticola* ATCC 33531. Therefore, the analysis based on the *rpoB* sequencing with 512 bp could not separate these species. A similar observation was

described by Brisse and Verhoef (2001) based on the analysis of *gyrA* and *parC* genes sequences and ribotyping data (6). However, a BLASTn search performed with about 1,000 bp of the *rpoB* gene is able to distinguish *R. ornithinolytica* from *R. planticola*. Furthermore, the ornithine decarboxylation test allows for the separation of isolates belonging to these two species (17, 24, 33).

All 122 isolates evaluated in the present study were resistant to ampicillin, as expected for Klebsiellae (22, 29, 43). All variants of the *K. pneumoniae* chromosomal β -lactamase confer resistance to ampicillin, amoxicillin, carbenicillin, and ticarcillin, but not to extended-spectrum β -lactams (1, 2, 21). *K. oxytoca* is naturally resistant to amino- and carboxy-penicillins and many isolates are resistant to aztreonam and third generation cephalosporins, with the characteristic exception of ceftazidime (29). As described with other isolates of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca*, *K. variicola* isolates were described as naturally resistant to ampicillin and carbenicillin (40). Klebsiellae clinical isolates are often multidrug-resistant, with an increasing proportion of ESBL production (29, 39, 41). In the present study, 28% (29 of 102) of the *K. pneumoniae*/*K. variicola*, and 47% (9 of 19) of the *K. oxytoca* isolates were ESBL producers. We also observed that three (K40, K115 e K166) of the five *K. variicola* isolates revealed ESBL production: this is the first report of ESBL production in the newly described *K. variicola* species. The *R. planticola* isolate was resistant only to ampicillin and did not reveal ESBL production, the same profile previously described for 13 *R. planticola* isolates from neonates (37).

ERIC-PCR typing revealed a diversity of genotypes in the present collection, indicating that cross transmission of isolates among patients was not important. A genotypic diversity as observed in our strain collection suggests that our results are not

affected by any unique epidemic strains, and might be applicable to other collections of isolates.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) of Brazil and Fogarty International Program in Global Infectious Diseases (TW006563) of the National Institute of Health. We are grateful to Maria de Lourdes Junqueira for storage of isolates.

References

1. **Arakawa, Y., M. Ohta, N. Kido, Y. Fujii, T. Komatsu, and N. Kato.** 1986. Close evolutionary relationship between the chromosomally encoded β -lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* and the TEM β -lactamase gene mediated by R plasmids. *FEBS Lett.* **207**:69-74.
2. **Babini, G. S., and D. M. Livermore.** 2000. Are SHV β -lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2230.
3. **Biedenbach D. J., G. J. Moet, and R. N. Jones.** 2004. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **50**:59-69.
4. **Boye, K., and D. S. Hansen.** 2003. Sequencing of 16S rDNA of *Klebsiella*: taxonomic relations within the genus and to other Enterobacteriaceae. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**:495-503.

5. **Brisse, S., and E. Duijkeren.** 2005. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. *Vet. Microbiol.* **105**:307-312.
6. **Brisse, S., and J. Verhoef.** 2001. 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.* **51**:915-924.
7. **Brisse, S., T. van Himbergen, K. Kusters, and J Verhoef.** 2004. Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:942-945.
8. **Carter, J.S., F. J. Bowden, I. Bastian, G. M. Myers, K. S. Sriprakash, and D. J. Kemp.** 1999. Phylogenetic evidence for reclassification of *Calymmatobacterium granulomatis* as *Klebsiella granulomatis* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1695-1700.
9. **Carter, J., S. Hutton, K. S. Sriprakash, D. J. Kemp, G. Lum, J. Savage, and F. J. Bowden.** 1997. Culture of the causative organism of donovanosis (*Calymmatobacterium granulomatis*) in Hep-2 cells. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2915-2917.
10. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2003. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Eighth Edition. CLSI Document M2-A8.
11. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S15.
12. **Conceição, T., A. Brízio, A. Duarte, and R. Barros.** 2005. First isolation of *bla*_{VIM-2} in *Klebsiella oxytoca* clinical isolates from Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:476.
13. **de Souza Lopes, A. C., J. Falcão Rodrigues, and de Moraes Junior, M. A.** 2005. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil.

Microbiol. Res. **160**:37-46.

14. **Drancourt, M., C. Bollet, A. Carta, and P. Rousselier.** 2001. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**:925-932.

15. **Drancourt, M., and D. Raoult.** 2005. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. J. Clin. Microbiol. **43**:4311-4315.

16. **Edwards, P. R., and W. H. Ewing.** 1986. Identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., New York, NY.

17. **Farmer III, J. J., B. R. Davis, F. W. Hickman-Brenner, A. McWhorter, G. P., Huntley-Carter, M. A. Asbury, C. Riddle, H. G. Wathen-Grady, C. Elias, G. R. Fanning, A. G. Steigerwalt, C. M. O'Hara, G. K. Morris, P. B. Smith, and D. J. Brenner.** 1985. Biochemical identification of new species and biotypes of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. **21**:46-76.

18. **Fevre, C., V. Passet, F. X. Weill, P. A. D. Grimont, and S. Brisse.** 2005. Variants of the *Klebsiella pneumoniae* OKP chromosomal beta-lactamase are divided into two main groups OKP-A and OKP-B. Antimicrob. Agents Chemother. **49**:5149-5152.

19. **Fevre, C., M. Jbel, V. Passet, F.-X. Weill, P. A. D. Grimont, and S. Brisse.** 2005. Six groups of the OXY β -lactamase evolved over millions of years in *Klebsiella oxytoca*. Antimicrob. Agents Chemother. **49**:3453-3462.

20. **Fischer, R., J. L. Penner, G. Zurinaga, C. Riddle, W. Sämisch, and D. J. Brenner.** 1989. Usefulness of trehalose fermentation and L-glutamic acid decarboxylation for identification of biochemically aberrant *Providencia stuartii* strains. J. Clin. Microbiol.

27:1969-1972.

21. **Haeggman, S., S. Löfdahl, and L. G. Burman.** 1997. An allelic variant of the chromosomal gene for class A β -lactamase K2, specific for *Klebsiella pneumoniae*, is the ancestor of SHV-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2705-2709.

22. **Haeggman, S., S. Löfdahl, A. Paauw, J. Verhoef, and S. Brisse.** 2004. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2400-2408.

23. **Hansen, D. S., A. Gottschau, and H. J. Kolmos.** 1998. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. *J. Hosp. Infect.* **38**:119-132.

24. **Hansen, D. S., H. M. Aucken, T. Abiola, and R. Podschun.** 2004. Recommended test panel for differentiation of *Klebsiella* species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3665-3669.

25. **Kwon, S. W., S. J. Go, H. W. Kang, J. C. Ryu, and J. K. Jo.** 1997. Phylogenetic analysis of *Erwinia* species based on 16S rDNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:1061-1067.

26. **Li, X., D. Zhang, F. Chen, J. Ma, Y. Dong, and L. Zhang.** 2004. *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:2131-2136.

27. **Lincopan, N., J. A. McCulloch, C. Reinert, V. C. Cassettari, A. C. Gales, and E. M. Mamizuka.** 2005. First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **43**:516-519.

28. **Liu, Y., B. J. Mee, and L. Mulgrave.** 1997. Identification of clinical isolates of indole-positive *Klebsiella* spp., including *Klebsiella planticola*, and a genetic and molecular

- analysis of their beta-lactamases. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2365-2369.
29. **Livermore, D. M.** 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:557-584.
30. **Livermore, D. M., and N. Woodford.** 2000. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:489-95.
31. **Mac Faddin, J.F.** 1976. Biochemical tests for identification of medical bacteria, Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
32. **Mollet, C., M. Drancourt, and D. Raoult.** 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.* **26**:1005-1011.
33. **Monnet, D., and J. Freney.** 1994. Method for differentiating *Klebsiella planticola* and *Klebsiella terrigena* from other *Klebsiella* species. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1121-1122.
34. **Monnet, D., J. Freney, Y. Brun, J.-M. Boeufgras, and J. Fleurette.** 1991. Difficulties in identifying *Klebsiella* strains of clinical origin. *Zentralbl. Bakteriol.* **274**:456-464.
35. **Mori, M., M. Ohta, N. Agata, N. Kido, Y. Arakawa, H. Ito, T. Komatsu, and N. Kato.** 1989. Identification of species and capsular types of *Klebsiella* clinical isolates, with special reference to *Klebsiella planticola*. *Microbiol. Immunol.* **33**:887-895.
36. **Pellegrino, F. L. P. C., L. M. Teixeira, M. G. S. Carvalho, S. A. Nouér, M. P. Oliveira, J. L. M. Sampaio, A. D. Freitas, A. L. P. Ferreira, E. L. T. Amorim, L. W. Riley, and B. M. Moreira.** 2002. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2420-2424.
37. **Podschun, R., H. Acktun, J. Okpara, O. Linderkamp, U. Ullmann, and M. Borneff-Lipp.** 1998. Isolation of *Klebsiella planticola* from newborns in a neonatal ward.

J. Clin. Microbiol. **36**:2331-2332.

38. **Podschun, R., and U. Ullmann.** 1992. Isolation of *Klebsiella terrigena* from clinical specimens. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **11**:349-352.

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

40. **Rosenblueth, M., L. Martínez, J. Silva, and E. Martínez-Romero.** 2004. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. Syst. Appl. Microbiol. **27**:27-35.

41. **Sader, H. S., R. N. Jones, A. C. Gales, J. B. Silva, A. C. Pignatari, and SENTRY Participants Group (Latin America).** 2004. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. Braz. J. Infect. Dis. **8**:25-79.

42. **Spröer, C., U. Mendrock, J. Swiderski, E. Lang, and E. Stackebrandt.** 1999. The phylogenetic position of *Serratia*, *Buttiauxella* and some other genera of the family *Enterobacteriaceae*. Int. J. Syst. Bacteriol. **49**:1433-1438.

43. **Stock, I., and B. Wiedemann.** 2001. Natural antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* and *K. terrigena* strains. J. Med. Microbiol. **50**:396-406.

44. **Watanakunakorn, C., and J. Jura.** 1991. *Klebsiella* bacteremia: a review of 196 episodes during a decade (1980-1989). Scand. J. Infect. Dis. **23**:399-405.

45. **Westbrook, G. L., C. M. O'Hara, S. B. Roman, and J. M. Miller.** 2000. Incidence and identification of *Klebsiella planticola* in clinical isolates with emphasis on newborns. J. Clin. Microbiol. **38**:1495-1497.

46. **Winn Jr., W. C., S. D. Allen, W. M. Janda, E. W. Koneman, G. Procop, P. C. Schreckenberger, and G. L. Woods.** 2006. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1535 p.

TABLE 1. Biochemical reactions for differentiation of 122 Klebsiellae isolates

Biochemical test	Number (%) of isolates with positive test				
	<i>K. pneumoniae</i> / <i>K. variicola</i> (total = 102)	<i>K. pneumoniae</i> ^a (total = 25)	<i>K. variicola</i> ^a (total = 5)	<i>K. oxytoca</i> (total = 19)	<i>R. planticola</i> (one isolate)
Lactose/Sucrose	101 (99)	25 (100)	5 (100)	19 (100)	1
H ₂ S	0	0	0	0	0
Indole	0	0	0	19 (100)	1
Motility	0	0	0	0	0
Citrate	102 (100)	25 (100)	5 (100)	19 (100)	1
Lysine	99 (97)	23 (92)	4 (80)	19 (100)	1
Ornithine	0	0	0	0	0
Arginine	0	0	0	0	0
Phenylalanine	0	0	0	0	0
Methyl red	5 (5)	3 (12)	2 (40)	3 (16)	1
Voges-Proskauer	98 (96)	23 (92)	3 (60)	19 (100)	0
Urease	100 (98)	23 (92)	5 (100)	19 (100)	1
Adonitol	89 (87)	22 (88)	1 (20)	NT	NT
Malonate	96 (94)	21 (84)	5 (100)	18 (95)	1
L-sorbose	47 (46)	13 (52)	5 (100)	19 (100)	1
Growth at 10°C	0	0	0	19 (100)	1
Histamine	0	0	0	0	1
D-Melezitose	0	0	0	16 (84)	0

NT: not tested.

^a : Includes only isolate with identification to species level by *rpoB* sequencing.

TABLE 3. Antimicrobial resistance in 121 *Klebsiellae* isolates evaluated in the present study

Antimicrobial agent	Number (%) of resistant isolates	
	<i>K. pneumoniae/K. variicola</i> (total = 102)	<i>K. oxytoca</i> (total = 19)
Amikacin	33 (32)	5 (26)
Amoxicillin-clavulanate	7 (8)	6 (32)
Ampicillin	102 (100)	19 (100)
Aztreonam	19 (19)	9 (47)
Cefepime	9 (9)	5 (26)
Cefoxitin	9 (9)	3 (16)
Ceftazidime	14 (14)	1 (5)
Cefotaxime	25 (25)	8 (42)
Cephalothin	43 (42)	12 (63)
Ciprofloxacin	12 (12)	6 (32)
Gentamicin	23 (23)	9 (47)
Imipenem	0	0
Trimethoprim-sulfamethoxazole	36 (35)	8 (42)

TABLE 2. Differentiation of *Klebsiella* and *Raoultella* species obtained from human clinical specimens according to results of the present study and references 14, 24, and 33

Bacterial species*	Indole	Growth at 10°C	Histamine	D-Melezitose	Ornithine
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-
<i>K. variicola</i>	-	-	-	-	-
<i>K. oxytoca</i>	+	+	-	+/-	-
<i>R. planticola</i>	+/-	+	+	-	-
<i>R. terrigena</i>	-	+	+	+	-
<i>R. ornithinolytica</i>	-	+	+	-	+

-: negative reaction; +: positive reaction; +/-: either positive or negative reaction

**K. granulomatis* and *K. singaporensis* included because isolates of these species cannot be cultured on conventional media (9) or are not obtained from human clinical specimens (26).

FIGURE 1. Phylogenetic tree derived from partial *rpoB* sequence of 47 Klebsiellae isolates and type strains determined by neighbor-joining distance method, using the Jukes & Cantor parameter model. Numbers within the tree indicate the occurrence (%) of the branching order in 100 bootstrapped trees. Only values above 50 are shown. The scale bar indicates 2% divergence. Clusters Kp, Kv, Rp/Ro, and Ko are indicated by arrows. Intra-species groups determined in two other trees (not shown) that included also the *rpoB* sequences studied by Fevre and collaborators (18, 19) are indicated by square brackets.

Artigo 2:

A case of severe pancreatitis complicated by *Raoultella planticola* infection

M. S. Alves^{1,2}, L. W. Riley³, and B. M. Moreira^{2,*}

¹Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Bairro Martelos, 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brazil

²Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Bloco I, Cidade Universitária, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³School of Public Health, University of California, Berkeley, 140 Warren Hall, 94720, Berkeley, CA, USA

This work was performed at:

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Bloco I
Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil and University of
California, Berkeley, 140 Warren Hall, Berkeley, CA, 94720, USA

* Correspondence:

Beatriz M. Moreira

Phone: 55-21-25626745

Fax: 55-21-25608344

E-mail: bmeurer@micro.ufrj.br

Running title: Infection by *Raoultella planticola*

A 45-year-old-male presented with severe pancreatitis. Two bacterial isolates obtained from peritoneal fluid and abdominal purulent secretion were identified to the species level by 15 biochemical tests and four supplementary tests as *Raoultella planticola*. Identification was confirmed by *rpoB* gene sequencing. *R. planticola* is difficult to identify in the clinical laboratory, and the clinical significance of this isolation remains

uncharacterized. This is the first report of pancreatitis with a primary infection by *R. planticola*.

Introduction

Raoultella planticola was first described as *Klebsiella planticola* in 1981 (Bagley *et al.*, 1981) and as *Klebsiella trevisanii* in 1983 (Ferragut *et al.*, 1983). In 1986, their extensive DNA sequence homology placed the two organisms into the same species (Gavini *et al.*, 1986). In 2001, based on 16S rDNA and *rpoB* sequences analysis, the new genus *Raoultella* was created, and the denomination *R. planticola* was proposed to accommodate *K. planticola* (Drancourt *et al.*, 2001).

R. planticola was initially seen as an aquatic, botanic, and soil bacteria. However, in 1984, a human infection caused by this organism was reported: a patient with sepsis, admitted to an intensive care unit in France (Freney *et al.*, 1984). Two other cases were later described: a bloodstream infection after a mitral valve replacement for infective endocarditis and a bacteremic pneumoniae after a coronary artery graft surgery (Freney *et al.*, 1986). No other case reports or case series of infections by *R. planticola* were published, and the clinical spectrum of diseases caused by this organism is unknown. The correct identification of *Raoultella* is not easily accomplished in most clinical microbiology laboratories, and isolates can be easily misidentified as *Klebsiella pneumoniae* or *Klebsiella oxytoca* (Hansen *et al.*, 2004; Monnet *et al.*, 1991; Monnet & Freney, 1994; Mori *et al.*, 1989; Podschun *et al.*, 1998; Westbrook *et al.*, 2000). In the present report we describe a patient with pancreatitis with a primary infection by *R. planticola*.

Case report

On September 2nd, 2003, a 45 year old male patient was admitted to a small (80 beds) public general hospital in Juiz de Fora, Minas Gerais state, Brazil, with abdominal pain, diarrhoea, and a 30-year history of alcoholism. After ten days of treatment for a suspect pneumoniae and no invasive procedures, abdominal symptoms persisted and the patient was transferred to Hospital Universitário of Universidade Federal de Juiz de Fora (HU/UFJF), on September 12th, 2003. On admission, he had abdominal pain, vomiting, diarrhoea and fever. Chest X-ray and abdominal CT scan revealed a small left pleural effusion and two abdominal fluid collections. Ciprofloxacin and metronidazole were started. On September 16th, the patient underwent an exploratory laparotomy. Pancreatitis with a retroperitoneal abscess was diagnosed, with inflammation of pancreatic body and tail. A Gram-negative bacterial isolate was obtained as pure culture from the peritoneal fluid collected before surgery (isolate K111) and from abdominal pyogenic secretion obtained during surgery (isolate K112). Other clinical specimens (urine, catheter tip and three blood samples) sent for cultures were negative. The patient made a full recovery after 15 days on imipenem and amikacin and placement of a new abdominal drainage. He was discharged on October 21st.

Bacterial isolates K111 and K112 were part of a surveillance study for characterization of Klebsiellae infections. Both bacterial isolates were identified as *Klebsiella oxytoca* in the original clinical laboratory by non-automated biochemical tests. Isolates were reevaluated in 15 biochemical tests for *Enterobacteriaceae* (Farmer *et al.*, 1985), and four supplementary tests (Drancourt *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 2004; Monnet & Freney, 1994). Both isolates formed typical red colonies indicating fermentation of lactose and acid production on MacConkey agar; were oxidase, H₂S, arginine, phenylalanine, and Voges-Proskauer negative; fermented glucose; were

citrate, lysine, malonate, L-sorbose, urease and metil red positive; and non-motile. Isolates were positive for indole production, histamine assimilation, growth at 10°C, and negative for ornithine and D-melezitose, and were identified as *R. planticola*. Biochemical identification was confirmed by *rpoB* gene sequencing as described (Drancourt *et al.*, 2001; Mollet *et al.*, 1997). The two *R. planticola* isolates* exhibited 98% *rpoB* sequence similarity to known *R. planticola* strains, including the type strain *R. planticola* ATCC 33531^T. By disk diffusion (CLSI, 2003; CLSI, 2005), isolates were resistant to ampicillin and susceptible to amikacin, amoxicillin-clavulanate, aztreonam, cefepime, cefotaxime, cefoxitin, ceftazidime, cephalothin, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem and trimethoprim-sulfamethoxazole, and did not exhibit ESBL production. A dendrogram of ERIC-PCR profiles (Pellegrino *et al.*, 2002) obtained with GelComparII, version 3.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), compared by the Dice index and the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA) is shown in Figure 1. The two isolates had identical banding profiles.

Discussion

The genus *Klebsiella* has been recently reanalyzed regarding its phylogenetic structure. All studies performed to date have shown the taxonomic heterogeneity of this organism, and the new genus *Raoultella* has been proposed for part of these isolates. The isolation of *R. planticola* from human specimens has been reported as part of various collections of isolates (Brisse & Verhoef, 2001; Freney *et al.*, 1984; Freney *et al.*, 1986; Monnet *et al.*, 1991; Mori *et al.*, 1989; Podschun *et al.*, 1994; Podschun *et al.*, 1998; Westbrook *et al.*, 2000). However, the clinical significance of this isolation remains uncharacterized. To date, only three case-reports described invasive diseases by

* The GenBank [EMBL/DDBJ] accession numbers for the [*rpoB*] sequences of two *Raoultella planticola* isolates are DQ415504 and DQ415505.

this organism (Freney *et al.*, 1984; Freney *et al.*, 1986). In the present report, *R. planticola* was repeatedly isolated in pure culture from intra-abdominal pyogenic specimens. The patient had pancreatitis with an infection that occurred without any abdominal manipulation. However, it is likely that previous antimicrobial exposure for the treatment of a questionable pneumoniae selected for this agent. *R. planticola*, like other *Raoultella* species, carries a chromosomal β -lactamase that makes this agent naturally resistant to several antimicrobial agents.

R. planticola is difficult to identify in the clinical laboratory. Nevertheless, the correct identification of bacterial species is the most important measure to guide antimicrobial treatment and detect outbreaks.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) of Brazil and Fogarty International Program in Global Infectious Diseases (TW006563) of the National Institute of Health. We are grateful to Maria de Lourdes Junqueira for storage of isolates.

References

- Bagley, S. T., Seidler, R. J. & Brenner, D. J. (1981).** *Klebsiella planticola* sp. nov.: a new species of *Enterobacteriaceae* found primarily in nonclinical environments. *Curr. Microbiol.* **6**, 105-109.
- Brisse, S. & Verhoef, J. (2001).** 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.* **51**, 915-924.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2003). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Eighth Edition. *CLSI* Document M2-A8.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2005). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. *CLSI* Document M100-S15

Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A. & Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 925-932.

Farmer III, J. J., Davis, B. R., Hickman-Brenner, F. W., McWhorter, A., Huntley-Carter, G. P., Asbury, M. A., Riddle, C., Wathen-Grady, H. G., Elias, C., Fanning, G. R., Steigerwalt, A. G., O'Hara, C. M., Morris, G. K., Smith, P. B. & Brenner, D. J. (1985). Biochemical identification of new species and biotypes of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **21**, 46-76.

Ferragut, C., Izard, D., Gavini, F., Kersters, K., De Ley, J. & Leclerc, H. (1983). *Klebsiella trevisanii*: a new species from water and soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 133-142.

Freney, J., Fleurette, J., Gruer, L. D., Desmonceaux, M., Gavini, F. & Leclerc, H. (1984). *Klebsiella trevisanii* colonisation and septicaemia. *Lancet* **1**, 909.

Freney, J., Gavini, F., Alexandre, H., Madier, S., Izard, D., Leclerc, H. & Fleurette, J. (1986). Nosocomial infection and colonization by *Klebsiella trevisanii*. *J. Clin. Microbiol.* **23**, 948-950.

Gavini, F., Izard, D., Grimont, P. A. D., Beji, A., Ageron, E. & Leclerc, H. (1986). Priority of *Klebsiella planticola* Bagley, Seidler, and Brenner 1982 over *Klebsiella trevisanii* Ferragut, Izard, Gavini, Kerters, De Ley, and Leclerc 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 486-488.

Hansen, D. S., Aucken, H. M., Abiola, T. & Podschun, R. (2004). Recommended test panel for differentiation of *Klebsiella* species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3665-3669.

Mollet, C., Drancourt, M. & Raoult, D. (1997). *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.* **26**, 1005-1011.

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

Monnet, D., Freney, J., Brun, Y., Boeufgras, J.-M. & Fleurette, J. (1991). Difficulties in identifying *Klebsiella* strains of clinical origin. *Zentralbl. Bakteriol.* **274**, 456-464.

Mori, M., Ohta, M., Agata, N., Kido, N., Arakawa, Y., Ito, H., Komatsu, T. & Kato, N. (1989). Identification of species and capsular types of *Klebsiella* clinical isolates, with special reference to *Klebsiella planticola*. *Microbiol. Immunol.* **33**, 887-895.

Pellegrino, F. L. P. C., Teixeira, L. M., Carvalho, M. G. S., Nouér, S. A., Oliveira, M. P., Sampaio, J. L. M., Freitas, A. D., Ferreira, A. L. P., Amorim, E. L. T., Riley, L. W. & Moreira, B. M. (2002). Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2420-2424.

Podschun, R., Acktun, H., Okpara, J., Linderkamp, O., Ullmann, U. & Borneff-Lipp, M. (1998). Isolation of *Klebsiella planticola* from newborns in a neonatal ward.

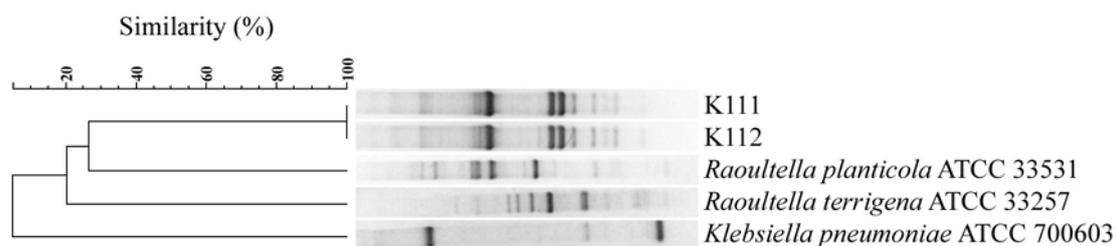
J. Clin. Microbiol. **36**, 2331-2332.

Podschun, R. & Ullmann, U. (1994). Incidence of *Klebsiella planticola* among clinical *Klebsiella* isolates. *Med. Microbiol. Lett.* **3**, 90-95.

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

Westbrook, G. L., O'Hara, C. M., Roman, S. B. & Miller, J. M. (2000). Incidence and identification of *Klebsiella planticola* in clinical isolates with emphasis on newborns. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1495-1497.

Fig. 1. Dendrogram obtained with *R. planticola* isolates K111 and K112 and other reference strains. The profile shown for *K. pneumoniae* ATCC 700603^T strain, with only three bands, was reproducible in the three experiments with independent DNA extractions.



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)