

DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE GENES ASSOCIADOS A FORMAÇÃO DE BIOFILME EM ISOLADOS DE *Klebsiella* *pneumoniae* RESISTENTES A CARBAPENÊMICOS

Bruno Acosta Xavier¹; Stella Buchhorn de Freitas²; Daniela Rodriguero
Wozeak²; Thayná Laner Cardoso²; Daiane Drawanz Hartwig³

¹Universidade Federal de Pelotas – bruno_acosta_xavier@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – stellafreitas@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – danielarwozeak@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nanalaner@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

1. Introdução

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram-negativo, não esporulado, capsulado, anaeróbio facultativo amplamente distribuído na natureza e comum na microbiota gastrointestinal de humanos e animais. Essa bactéria é considerada um patógeno oportunista, causando infecções, principalmente, em pacientes imunocomprometidos com alguma comorbidade ou procedimento hospitalar. Nas últimas décadas, *K. pneumoniae* tem se tornado um dos principais agentes de infecções hospitalares, devido ao surgimento e dispersão de clones virulentos e multidroga-resistentes (MDR) (MORADIGARAVAND *et.al.* 2017). Dentre os quadros clínicos ao qual está relacionado, destacam-se infecções no trato respiratório e urinário, feridas cirúrgicas, quadros de meningite, osteomielite, septicemia e úlceras. (ROSA *et. al.* 2015).

A ocorrência de cepas de *K. pneumoniae* MDR é um problema de saúde pública global e está associada a diversos mecanismos de resistência, dentre eles a presença de enzimas do tipo beta lactamases de espectro estendido (ESBL). Como consequência, essas infecções tornam-se difíceis de tratar com antimicrobianos da classe das penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (VUOTTO *et. al.* 2017). Os carbapenêmicos são uma classe de antibióticos que, devido ao seu amplo espectro, são comumente utilizados no tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos (SHAHCHERAGHI *et.al.* 2017), muitas vezes sendo utilizados como último recurso nesses tratamentos. Entretanto, em função do uso indiscriminado deles, tem aumentado os relatos de cepas resistentes.

Um fator que corrobora para a resistência aos antimicrobianos é a capacidade desses isolados formarem biofilme. Biofilme são comunidades bacterianas embebidas em uma matriz de exopolissacarídeo composta por proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos (CEPAS *et. al.* 2019). Essa estrutura permite a fixação de bactérias em superfícies dificultando a eliminação desses microrganismos de dispositivos médicos, como equipamentos de suporte respiratório e cateteres. Sendo assim, torna-se importante a identificação de genes associados a formação de biofilme e resistência a antibióticos nestes isolados.

Diante disso o presente trabalho teve como objetivo a identificação de genes associados a formação de biofilme e de resistência a antimicrobianos em isolados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos.

2. Metodologia

Isolados clínicos: doze isolados clínicos de *K. pneumoniae* pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos, da Universidade Federal de Pelotas, foram utilizados nesse estudo. Os isolados foram previamente identificados bioquimicamente e quanto ao perfil de resistência aos carbapenêmicos pelo sistema automatizado VITEK 2 GN System (BioMerieux). Os isolados foram armazenados a -20°C em caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI), acrescidos de 10% de glicerol.

Obtenção de DNA genômico: O DNA total foi obtido através do método de fervura (BARATTO e MEGIOLARO, 2012. Com modificações). Para isso, os isolados foram crescidos em caldo BHI a 37°C por 16-18 horas e posteriormente centrifugados a 17.300 g por 1 min. O pellet foi suspenso em 1 µL de soro fisiológico estéril e centrifugado novamente sob as mesmas condições. O sobrenadante foi removido e o pellet foi suspenso em 100 µL de tampão de eluição (10mM de Tris-base, 1mM de EDTA, pH 8). As células foram submetidas à 100°C, por 10 min e o sobrenadante estocado a -20°C.

Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da Polimerase): a detecção dos genes foi realizada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Seis genes foram avaliados: *bla_{KPC}* (carbapenemases), *dnaA* (*K. pneumoniae* específico), *fimA-fimH* (subunidades da fímbria tipo 1), *mrkD* (fímbria tipo 3) e *rmp* (polissacarídeo capsular) (Tabela 1). A reação foi composta de 13 µL de Master Mix (Promega, USA), 1 µL de cada primer (forward e reverse), 5 µL de DNA total extraído, completando o volume para 25 µL de reação com água ultrapura. As condições de termociclagem foram: 94 °C por 5 min, seguidos de 35 ciclos a: 94 °C por 1 min, 61 °C por 30 s, 72 °C por 1 min e 72 °C por 7 min. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada através em gel de agarose 1,5%.

Tabela 1. Sequências de *primers* utilizados para amplificação dos genes associados a formação de biofilme e resistência a antimicrobianos, em isolados de *K. pneumoniae*.

Gene	Primers	Sequência de nucleotídeos 5'-3'	Tamanho	Referência
<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{KPC}-for</i>	GTA TCG CCG TCT AGT TCT GCT G	860 pb	Galetti, 2010
	<i>bla_{KPC}-rev</i>	GTT GAC GCC CAA TCC CTC GA		
<i>dnaA</i>	<i>dnaA-for</i>	TGC CAA GCG ACT GCG CTC AA	467 pb	Campos <i>et. al.</i> , 2016
	<i>dnaA-rev</i>	AGC TCT TTG GCC AGC GCC AT		
<i>fimA</i>	<i>fimA-for</i>	CGG ACG GTA CGC TGT ATT TT	500 pb	Alcántar-Curiel <i>et al.</i> , 2013
	<i>fimA-rev</i>	GCT TCG GCG TTG TCT TTA TC		
<i>fimH</i>	<i>fimH-for</i>	CAC GCA AGG CAC CAT TC	900 pb	Stahlhut <i>et al.</i> , 2009

	<i>fimH</i> -rev	GCT CAG AAT CAA CAT CGG TAA C		
<i>Rmp</i>	<i>rmp</i> -for	GCA GTT AAC TGG ACT ACC TCT G	322 pb	Fang et al., 2007
	<i>rmp</i> -rev	GTT TAC AAT TCG GCT AAC ATT TTT CTT TAA G		
<i>mrkD</i>	<i>mrkD</i> -for	TTG TTG CTG CTG GTT TGG TTC	600 pb	GenBank accession no. M2456 and M55912
	<i>mrkD</i> -rev	CGA GTT TCC TGG CTT TGT AAT G		

3. Resultados

Todos os isolados utilizados neste estudo apresentaram o gene *dnaA*, que é espécie-específico, confirmando os isolados como sendo *K. pneumoniae*. Nos doze isolados a presença do gene *bla_{KPC}* também foi confirmada, gene este que confere resistência a carbapenêmicos. Os genes *fimH* e *mrkD*, genes que codificam uma subunidade da fímbria tipo 1 e fímbria tipo 3, respectivamente, não foram identificados em nenhum dos isolados. Da mesma forma, o gene *rmp*, que codifica um polissacarídeo celular, também não foi identificado em nenhum dos isolados. Já o gene *fimA* foi identificado em sete isolados (58,3%), esse gene codifica para uma subunidade da fímbria tipo 1, cuja estrutura é responsável pela adesão da bactéria em superfícies. Estes resultados podem ser observados na tabela 2.

Apesar da presença de genes relacionados a formação de biofilme, não se pode afirmar que esses isolados são formadores, sendo necessário mais testes para confirmar a síntese desse fator de virulência.

Tabela 2. Identificação dos genes *bla_{KPC}*, *dnaA*, *fimA*, *fimH* e *rmp* em 12 isolados de *K. pneumoniae*.

Isolados	<i>bla_{KPC}</i>	<i>dnaA</i>	<i>fimA</i>	<i>fimH</i>	<i>rmp</i>	<i>mrkD</i>
KPC 2	+	+	+	-	-	-
KPC 3	+	+	-	-	-	-
KPC 4	+	+	+	-	-	-
KPC 5	+	+	+	-	-	-
KPC 6	+	+	+	-	-	-
KPC 7	+	+	-	-	-	-
KPC 8	+	+	+	-	-	-
KPC 9	+	+	-	-	-	-
KPC 10	+	+	-	-	-	-
KPC 11	+	+	-	-	-	-

KPC12	+	+	+	-	-	-
KPC 13	+	+	+	-	-	-

+ indica presença do gene; - indica ausência do gene.

4. Conclusão

Em todos os isolados testados foi identificada a presença dos genes *bla_{KPC}* e *dnaA*. Em relação aos genes associados a formação do biofilme, em 58,3% deles foi encontrado o gene *fimA*, porém, nenhum dos isolados apresentou os genes *fimH*, *rmp* e *mrkD*. A presença de genes avaliados neste estudo, relacionados a formação do biofilme e resistência aos carbapenêmicos, pode favorecer a persistência do patógeno no ambiente hospitalar.

5. Referências

- ALCÁNTAR-CURIEL, M. D.; et. al. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. **Virulence**. v.4, n.2, p.129-138, 2013.
- BARATTO, C. M.; MEGIOLARO, F. Comparação de diferentes protocolos de extração de dna de bactérias para utilização em RAPD-PCR. **Unoesc & Ciência – ACET**. v. 3, n. 1, p. 121-130, 2012.
- CAMPOS, P. A. de; et. al. Multidrug Resistance Related to Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains from Different Pulsotypes. **Current Microbiology**. v.72, n.5, p.617-627, 2016.
- CEPAS, V.; et. al. Relationship Between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. **Microbial Drug Resistance**. v.25, n.1, p.72-79, 2019.
- FANG, CT.; et. al. *Klebsiella pneumoniae* Genotype K1: An Emerging Pathogen That Causes Septic Ocular or Central Nervous System Complications from Pyogenic Liver Abscess. **Clinical Infectious Diseases**. v.45, n.3, p.284–293, 2007.
- GALETTI, R.; **Estudo de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamase e de genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos**. 2010. 49f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- ROSA, F. G. de.; et. al. *Critical issues for Klebsiella pneumoniae KPC-carbapenemase producing K. pneumoniae infections: a critical agenda*. **Future Microbiology**. v.10, n.2, p.283–294, 2015.
- STAHLHUT, S. G.; et. al. Population Variability of the FimH Type 1 Fimbrial Adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**. v.191, n.6, p.1941-1950, 2009.
- MORADIGARAVAND, D.; et. al. Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. **American society for Microbiology**. v.8, n.1, p.1-13, 2017.
- SHAHCHERAGHI, F.; et. al. Molecular study of carbapenemase genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae resistant to carbapenems and determining their clonal relationship using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Medical Microbiology**. p.1-7, 2017.
- VUOTTO, C.; et. al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. **Journal of Applied Microbiology**. V.123, p.1003—1018, 2017.