

Talissa Kuratomi

**TRANSLOCAÇÃO POR VIA INTESTINAL DE
AMOSTRAS DE *Klebsiella pneumoniae*. PAPEL DA
ADESINA CF29K**

**Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências.**

**São Paulo
2008**

Talissa Kuratomi

**TRANSLOCAÇÃO POR VIA INTESTINAL DE
AMOSTRAS DE *Klebsiella pneumoniae*. PAPEL DA
ADESINA CF29K**

**Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências.**

**Orientadora:
Profa. Dra. Rosa Maria Silva
Co-orientador:
Prof. Dr. Ivan Hong Jun Koh**

**São Paulo
2008**

Kuratomi, Talissa

Translocação por via intestinal de amostras de *Klebsiella pneumoniae*. Papel da adesina CF29K. / Talissa Kuratomi — São Paulo, 2008.

x, 75.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia.

Título em inglês: Intestinal Bacterial Translocation by *Klebsiella pneumoniae*. Role of the CF29K adhesin.

1. *Klebsiella pneumoniae*. **2.** Translocação bacteriana . **3.** CF29K. **4.** Adesina.



Universidade Federal de São Paulo

Escola Paulista de medicina



**Departamento de Microbiologia, Imunologia e
Parasitologia**

Disciplina de Microbiologia

Chefe de Departamento: Prof. Dr. José Daniel Lopes

Chefe de Disciplina: Profa. Dra. Rosa Maria Silva

Coordenador da Pós-Graduação: Prof. Dr. Renato Arruda Mortara

São Paulo

2008

Este trabalho foi desenvolvido na Disciplina de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo / Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Perseverar, sempre !

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
4. RESULTADOS	33
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
8. ANEXO - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES	68
8.1 – Meio para armazenamento das culturas bacterianas	68
8.2 – Soluções para extração de DNA plasmidial	68
8.2.1 – Solução I (solução de lise)	68
8.2.2 – Solução II (solução desnaturante)	69
8.2.3 – Solução III – Acetato de sódio a 3 M, pH 4,8 (solução neutralizante)	69
8.2.4 – Solução IV - Acetato de sódio a 100 mM, pH 7,0	69
8.3 – Tampão Tris (10 mM) – EDTA (1 mM) – TE	69
8.4 – Corante para corrida eletroforética de DNA	70
8.5 – Tampão Tris-Borato-EDTA 5X (TBE 5X)	70
8.6 – Soluções para hibridação de DNA	70
8.6.1 – Solução desnaturante	70
8.6.2 – Solução de neutralização	71
8.6.3 - Solução salina-citrato 20X (SSC-20X)	71
8.6.4 – Solução de hibridação	71
8.7 – Solução de acetato de sódio 3M, pH 7,0	72
8.8 – Solução tampão salina-fosfato de Dulbecco-Vogt, (PBS) 0,1M, pH 7,2 ..	72
8.9 – Soluções para realização de eletroforese de proteínas em gel de agarose na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) e solução corante	72
8.9.1 – Solução tampão de amostra (4X)	72

8.9.2 – Solução de acrilamida-bisacrilamida	72
8.9.3 – Solução tampão Tris-HCl, pH 8,8	73
8.9.4 – Solução tampão Tris-HCl, pH 6,8	73
8.9.5 – Solução tampão de corrida	73
8.9.6 – Solução de “Coomassie brilliant blue – R-250”	73
8.10 – Soluções para realização do “Western-blot”	74
8.10.1 – Solução tampão de transferência	74
8.10.2 – Solução corante de Ponceau	74
8.11 – Solução tampão PBS-Tween (PBS-T), 0,1 M, pH 7,4	74
8.12 – Solução tampão PBS-Tween – Leite Molico® a 5 %	74
8.13 – Meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco para cultivo de células Caco-2	74
8.14 – Solução de D-manose a 10%	75
8.15 – Solução corante de May-Grunwald	75
8.15.1 – Solução tampão de Sørensen a 0,33M	75
8.15.2 – Solução de eosina-azul de metileno segundo May-Grunwald	75
8.16 – Solução de Azul-eosina de metileno segundo Giemsa	75

RESUMO

O gênero *Klebsiella* faz parte da família *Enterobacteriaceae* e pode ser encontrado no meio ambiente e nas mucosas de seres humanos e animais. Atualmente, o gênero é composto de cinco espécies, das quais a *K. pneumoniae*, e mais raramente, a *K. oxytoca*, são causadoras de infecções. As infecções por *K. pneumoniae* acometem primordialmente indivíduos hospitalizados, geralmente fragilizados por outras condições, que acabam, na maioria das vezes, desenvolvendo infecções do trato urinário, lesões supurativas, bacteremias e septicemia. Além disso, a *K. pneumoniae* encontra-se entre as espécies mais comumente implicadas em infecções por microorganismos resistentes a antibióticos, sendo, depois de *Escherichia coli*, a causa mais comum de septicemia por Gram-negativos. O primeiro estágio da infecção hospitalar por *K. pneumoniae* consiste na colonização do trato gastrointestinal. A translocação bacteriana (TB), definida como a passagem de bactérias viáveis através da mucosa intestinal, é um processo endógeno que se coloca como hipótese para a ocorrência dessas infecções. A colonização intestinal demanda que as bactérias estejam firmemente estabelecidas na superfície da mucosa para resistir aos movimentos peristálticos do intestino. A proteína CF29K, descrita em uma amostra clínica de *K. pneumoniae*, é uma adesina não fimbrial que demonstrou mediar uma adesão do tipo difuso em células cultivadas de origem intestinal. Praticamente, não há relatos sobre o papel desta adesina no potencial patogênico de *K. pneumoniae*. Tampouco há demonstração da capacidade de *K. pneumoniae* translocar por via intestinal em modelo animal imunologicamente competente e que não apresente lesão da barreira mucosa. O objetivo geral deste trabalho foi estudar o envolvimento da adesina afimbrial CF29K no processo de translocação de *K. pneumoniae* por via intestinal. O ensaio de TB realizado em modelo *in vivo*, mostrou que a *K. pneumoniae* CF504, protótipo de CF29K, é capaz de translocar para linfonodos do mesentério, fígado e baço. Este achado reveste-se de grande consistência na medida em que o modelo de TB empregado não expõe o animal a fatores que levam ao dano da barreira intestinal. A supressão da expressão da adesina CF29K, obtida por mutagênese específica do gene *cf29A*, da amostra *K. pneumoniae* CF504, não interferiu na sua capacidade de aderir a células Caco-2, sugerindo que outra(s) adesina(s) também deva desempenhar este papel na

amostra selvagem. Da mesma forma, a ausência de CF29K não resultou em menor eficiência de translocação por via intestinal. Além disso, o estudo de 27 amostras clínicas de *K. pneumoniae* não detectou o gene *cf29A* em nenhum dos isolados. No entanto, o teste de TB realizado com 15 dessas amostras resultou positivo. Conclui-se, portanto, que a translocação bacteriana por via intestinal é um processo que independe da adesina CF29K e que deve refletir um possível mecanismo de patogenicidade de *K. pneumoniae* envolvido, seja na instalação da infecção per se, seja no agravamento de quadros infecciosos sistêmicos já instalados.

ABSTRACT

Klebsiella is a member of the family *Enterobacteriaceae* and can be isolated from the environment and from the mucosal surfaces of human beings and animals. There are five known species of *Klebsiella*, being *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* the most associated with infections. Mainly hospitalized patients are infected and can present urinary tract infections, suppurative lesions, bacteremia, and septicemia. *K. pneumoniae* strains presenting high resistance to antibiotics are the most common Gram negatives causing septicemia after *Escherichia coli*. Colonization of the intestinal tract is the first stage in the nosocomial infections by *K. pneumoniae*. Being so, bacterial translocation (BT), defined as the passage of viable bacteria through the intestinal barrier, is an endogenous process that applies as a hypotheses for the occurrence of those infections. Intestinal colonization demands a firm interaction between the bacteria and the mucosal surface so they can resist to the intestinal peristalses. The CF29K protein discovered in a clinical isolate of *K. pneumoniae*, is an afimbrial adhesin responsible for diffuse adhesion to intestinal cells *in vitro*. There is no acknowledge on the role of this adhesin to the pathogenesis of *K. pneumoniae*, neither on the ability of these bacteria to translocate through the intact intestinal barrier of immunological competent animal models. The aim of this study was to evaluate the involvement of the adhesin CF29K in the BT process. It was shown that CF504, the prototype *K. pneumoniae* strain for CF29K, is able to translocate trough the intestinal barrier of rats, being recovered from mesenteric lymph nodes, liver, and spleen, after two hours of inoculation. This fact gains importance since the BT assay used causes no physical damage to the intestinal mucosa. The suppression of the CF29K protein expression obtained by site-direct mutagenesis of the *cf29A* gene of the prototype strain did not change its ability to adherer to Caco-2 cells, suggesting that there might be other (s) adhesin(s) also involved in this interaction. Nevertheless, the absence of CF29K did not abolish the BT capacity of the strain. Besides, the study of 27 clinical isolates of *K. pneumoniae* did not detect the presence of *cf29A* gene in any strain. Even so, the BT test carried out with 15 of those isolates resulted positive. We conclude that BT across the intestinal mucosa is a process not related to the adhesin CF29K. We propose that BT may reflect a possible mechanism of

pathogenicity of *K. pneumoniae* involved either in the installation of the infection, or in the worsening of already installed systemic infection.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Klebsiella* faz parte da família *Enterobacteriaceae* podendo habitar mucosas de humanos e animais (PODSCHUN & ULLMANN, 1998), e o meio ambiente como o solo, a água, plantas e esgotos (BAGLEY *et al.*, 1978; BROWN & SEIDLER, 1973; EDBERG *et al.*, 1986; MATSEN *et al.*, 1974; SEIDLER *et al.*, 1975). A taxonomia que tem sido aceita é a proposta por Orskov (1984) que propõe a divisão do gênero entre as espécies *K. pneumoniae* (subespécies *pneumoniae*, *ozaenae* e *rhinoscleromatis*), *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. planticola* e *K. ornithinolytica*. A *K. pneumoniae* sbsp. *pneumoniae*, doravante denominada apenas *K. pneumoniae*, é a mais freqüentemente isolada de casos de infecção em humanos seguida de longe pela *K. oxytoca* (PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

Em humanos, *K. pneumoniae* é uma espécie saprófita nas mucosas da nasofaringe e do trato gastrointestinal, sendo transitória na pele. A freqüência de portadores varia entre 1 a 6% na nasofaringe e de 5 a 8% no intestino (PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

No ambiente hospitalar, os trabalhadores apresentam taxas elevadas de colonização por *K. pneumoniae* (CASEWELL & PHILLIPS 1978; CASEWELL & PHILLIPS, 1977; COOKE *et al.*, 1979) e os pacientes podem apresentar até 77 % nas fezes e 42% nas mãos (COOKE *et al.*, 1979; POLLACK *et al.*, 1972; SMITH *et al.*, 1973). Esta alta freqüência de colonização é proporcional ao tempo de internação (PODSCHUN & ULLMANN, 1998) e parece dever-se mais ao uso de antibióticos do que a fatores ligados aos cuidados prestados (POLLACK *et al.*, 1972; ROSE &

SCHREIER, 1968). Acredita-se que, além das mãos do pessoal cuidador, o trato intestinal seja o principal reservatório para transmissão de *Klebsiella* spp. no ambiente hospitalar (MONTGOMERIE, 1979).

Klebsiella pneumoniae é bem conhecida dos clínicos como causa de pneumonia bacteriana adquirida na comunidade, principalmente em alcoólatras crônicos e com anormalidades radiológicas, devido á infecção piogênica severa que resulta em alta taxa de mortalidade quando não tratada (CARPENTER, 1990). Entretanto, a maioria das infecções por *Klebsiella pneumoniae* é associada à hospitalização. Trata-se, portanto, de um patógeno oportunista que acomete pacientes imunocomprometidos, hospitalizados, causando, na maioria das vezes, infecções do trato urinário (DI MARTINO *et al*, 1995), além de lesões supurativas, bacteremias e septicemia (DARFEUILLE-MICHAUD *et al*, 1992; DE CHAMPS *et al*, 1989; MARKOWITZ *et al*, 1980).

Há muitos estudos relacionados direta ou indiretamente à patogenicidade de *K. pneumoniae* que foram, na sua maioria, realizados no período entre os anos 70 e 90, o que justifica o grande número de citações dessa época neste trabalho. Entretanto, na década de 80, o aparecimento de cepas múltiplo-resistentes incluindo as produtoras de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) que conferem resistência a cefalosporinas de terceira geração (SHANNON *et al*, 1998), reacendeu o interesse em se estudar os fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade dessa espécie.

Estudos de vigilância do perfil de resistência bacteriana realizados em vários centros da América Latina, incluindo o Brasil, mostram *K. pneumoniae* como o quinto agente mais frequentemente isolado em bacteremias, o terceiro entre os isolados clínicos de infecções do trato respiratório inferior e o segundo em infecções urinárias

(SADER, 2001; OTMAN *et al*, 2002; LINCOPAN *et al*, 2005). A *K. pneumoniae* encontra-se entre as espécies mais comumente implicadas em infecções hospitalares por microorganismos resistentes à antibióticos (TOLTZIS, 2001 e QAVI *et al*, 2005), sendo, depois de *E.coli*, a causa mais comum de septicemia por Gram-negativos (DI PERSIO *et al*, 2005; HANSEN *et al*, 1998; BRYAN *et al*, 1983; DUGGAN *et al*, 1985; PITTET *et al*, 1993; YINNON *et al*;1996), particularmente em neonatos (GOTOFF, 1992).

Modelos tanto *in vitro* como *in vivo* têm sido utilizados para investigar a interação entre bactérias e seus hospedeiros. Em particular os modelos *in vivo* usados no estudo da patogenicidade de *Klebsiella* têm sido importantes para propiciar informações que não seriam obtidas de estudos *in vitro* (PODSCHUN & ULLMANN, 1998). É digno de nota o desenvolvimento de modelos de infecção urinária em camundongos e ratos e sua contribuição sobre os fatores de virulência envolvidos nesta síndrome clínica (FADER & DAVIS, 1980; FADER & DAVIS,1982; MAAYAN *et al*, 1985).

Assim, diversos fatores estruturais e/ou secretados têm sido estudados quanto ao seu envolvimento com a patogenicidade de *Klebsiella* dentre os quais: a cápsula, o lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular, as proteínas de membrana externa, sideróforos e adesinas.

Em geral as klebsiellas têm cápsulas proeminentes, constituídas de polissacarídeos ácidos complexos, contendo ácidos urônicos que conferem à célula uma carga negativa (PODSCHUN & ULLMANN, 1998). Há 77 tipos sorológicos (ORSKOV & ORSKOV, 1984). São considerados fatores de virulência essenciais (CRYZ *et al*, 1984; HIGHSMITH & JARVIS, 1985) que protegem contra a fagocitose por leucócitos polimorfonucleares (PODSCHUN & ULLMANN, 1992; SIMOONS-

SMIT *et al*, 1986) e também contra a atividade bactericida do soro (WILLIAMS *et al*, 1983; WILLIAMS & TOMAS, 1990, SUERBAUM *et al*, 1994). Além destes, é possível que outras propriedades relacionadas à virulência sejam atribuídas à cápsula como prejuízo na função de macrófagos observada *in vitro* (OFEK *et al*, 1993; KABHA *et al*, 1995) e paralisia imunológica (prejuízo na produção de anticorpos (apud PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

A resistência ao Complemento do soro é uma das primeiras linhas de defesa, juntamente com a fagocitose mediada por leucócitos polimorfonucleares, contra microorganismos invasores (PODSCHUN & ULLMANN, 1998). Cepas comensais geralmente são sensíveis ao complemento enquanto cepas patogênicas são resistentes (OLLING, 1977). De fato, a resistência ao soro foi relacionada com instalação da infecção (ROANTREE & RANTZ, 1960) e severidade da doença (BJÖRKSTEN & KAIJSER, 1978; GOWER *et al*, 1972). Embora o exato mecanismo de resistência ao soro seja desconhecido, vários componentes de superfície têm sido implicados. Em *Klebsiella* spp., é possível que a cápsula e/ou o antígeno O, em particular do tipo O1, sejam importantes na medida em que, podem dificultar a deposição do componente C3b sobre a membrana citoplasmática, impedindo a formação do complexo C5b-C9 em seu sítio de ação (TOMAS *et al*, 1988; MERINO *et al*, 1992, ALBERTI *et al*, 1996). O LPS ainda pode ter outra ação anti-complementar impedindo a ligação do C1q às porinas, o que restringe a ativação da via clássica do complemento (ALBERTI *et al*, 1993).

Além dos mecanismos de defesa, o suprimento de Ferro também é um fator limitante do crescimento bacteriano *in vivo*, pois no hospedeiro ele encontra-se complexado a proteínas, tanto intra como extracelularmente, tornando a concentração de Ferro livre extremamente baixa e inadequada ao desenvolvimento

bacteriano (BULLEN *et al*, 1978). As bactérias produzem os sideróforos, proteínas de baixo peso molecular e com alta afinidade por Ferro (GRIFFITHS *et al*, 1988) para obter esse elemento essencial quando no interior do hospedeiro. Dois tipos de sideróforos têm sido detectados em *Klebsiella*, a enterobactina, tipo fenolato, que é praticamente universal entre as bactérias, tem papel controverso na patogenicidade; e a aerobactina, sideróforo do tipo hidroxamato, com papel claro na patogenicidade (DE LORENZO & MARTINEZ, 1988). Foi demonstrado que mesmo cepas de *K. pneumoniae* não produtoras de aerobactina, podem ser capazes de captá-la do meio externo (WILLIAMS *et al.*, 1989).

Outros fatores de virulência foram descritos em *K. pneumoniae* como citotoxinas (HIGAKI *et al.* 1990; MINAMI *et al*, 1994), enterotoxinas ST (GUARINO *et al*, 1989; KLIPSTEIN *et al*, 1983; KLIPSTEIN & ENGERT, 1977; ZIDKO, 2008) e LT (MINAMI *et al*, 1994; ZIDKO, 2008); e hemolisinas (BARBERIS *et al*, 1986; ALBESA *et al*, 1985a; ALBESA *et al*, 1985b, SANTOS, 2008), mas seu papel na patogenicidade de *K. pneumoniae* carece de comprovação.

O primeiro estágio da infecção hospitalar por *K. pneumoniae* consiste na colonização do trato gastrointestinal, o que demanda que as bactérias estejam firmemente estabelecidas na superfície da mucosa, sendo assim, capazes de resistir aos movimentos peristálticos do intestino. Para isso, o patógeno requer fatores especializados que se ligam especificamente às células do hospedeiro, e diversas adesinas podem estar envolvidas nestas interações (MARONCLE *et al*, 2002). Fímbrias ou pili são estruturas capiliformes, geralmente aglutinantes de diversos tipos de hemáceas, seja na presença (hemaglutinação manose-resistente) ou na ausência de manose (hemaglutinação manose-sensível).

Atualmente conhece-se três tipos de fímbrias em *Klebsiella* spp.: a tipo 1 que promove aglutinação de hemáceas na ausência de manose (MSHA), a tipo 3 que promove hemaglutinação manose-resistente (MR/KA) (OLD *et al*, 1985; PODSCHUN *et al*, 1987) e a fímbria KPF-28, também hemaglutinante (DI MARTINO *et al*, 1996). A fímbria tipo 1, largamente presente também em outras enterobactérias, promove a interação com glicoproteínas por meio de resíduos de manose (FIRON *et al*, 1984), ligando a bactéria ao muco, células epiteliais dos tratos urogenital, respiratório e intestinal (BALISH *et al*, 1982; VENEGAS *et al*, 1995), promovendo a colonização e facilitando a infecção desses sítios (CLEGG & GERLACH, 1987).

A fímbria tipo 3, embora designada MR/K-HA (hemaglutinina manose resistente de *Klebsiella*) não é exclusiva desse gênero (CLEGG & GERLACH, 1987; OLD & ADEGBOLA, 1985, TARKKANEN *et al*, 1990). Seu papel como fator de virulência de *Klebsiella* não está determinado (PODSCHUN & ULLMANN, 1998) apesar de estar envolvida na adesão a células endoteliais do trato respiratório e epitélio urinário (HORNICK *et al*, 1992; TARKKANEN *et al*, 1997; WÜRKER *et al*, 1990). Recentemente essa fímbria foi associada à formação de biofilmes em superfícies abióticas (DI MARTINO *et al*, 2003; BURMØLLE *et al*, 2008)

A fímbria KPF-28, aparentemente restrita a *K. pneumoniae* produtoras de beta-lactamases do tipo SHV-4/CAZ-5, gera um padrão de aderência difusa em linhagens de células intestinais de carcinoma de colon humano (Caco-2), está envolvida com casos de diarreia sanguinolenta em crianças (DI MARTINO *et al*, 1996 e GUERIN *et al*, 1998). Embora codificada em plasmídeo, sua funcionalidade depende de genes cromossomais (DI MARTINO *et al*, 1996).

Favre & Bonté *et al* (1995) descreveram uma adesina semelhante à cápsula que confere o fenótipo de adesão agregativa em células intestinais embrionárias Int 407 mas que requer maior caracterização.

Finalmente, foi descrita por Darfeuille-Michaud *et al* (1992) a proteína CF29K, adesina não fimbrial, presente em uma amostra de *K. pneumoniae* isolada do sangue de um paciente internado na UTI do hospital Clermont-Ferrand na França em 1988. Trata-se de uma proteína com cerca de 29 KDa, codificada pelo gene *cf29A* que encontra-se associado a genes de resistência a antimicrobianos, produtores de ESBL, em um plasmídeo conjugativo (pCF504) de 185 kb (DI MARTINO *et al*, 1995). A análise de sua seqüência N-terminal (DI MARTINO *et al*, 1995) mostrou que a mesma possui praticamente 100% de homologia com a proteína CS31A-L, codificada pelo gene *c/pG*, e presente na superfície de amostras de *E.coli* envolvidas em casos de septicemia bovina e em amostras toxigênicas (GIRARDEAU *et al*, 1988). Além disso, CF29K também apresentou alto grau de homologia com K88, uma adesina de *E.coli* enterotoxigênica relacionada a surtos de diarréia suína; e com NFA-4, uma adesina de *E.coli* associada a infecções no trato urinário humano (GAASTRA & DE GRAAF, 1982; HOSCHUTZKY, *et al.*, 1989).

A proteína CF29K demonstrou ser capaz de mediar uma adesão do tipo difusa em células intestinais, tanto Caco-2 (carcinoma de colon humano) (PINTO *et al*, 1983), quanto Int-407 (carcinoma de jejuno e íleo de embrião humano) (DARFEUILLE-MICHAUD *et al*, 1992; DI MARTINO *et al*, 1995). Praticamente, não há relatos sobre o papel destas adesinas no potencial patogênico de *K. pneumoniae*.

Alguns autores acreditam que a pressão exercida pelo uso extensivo de antibióticos não explica totalmente a persistência e o espalhamento de patógenos oportunistas como a *K. pneumoniae* que é um típico patógeno nosocomial como já

mencionado. Trabalhos anteriores demonstraram que as infecções hospitalares por este patógeno ocorrem após colonização do trato gastrintestinal (DE CHAMPS *et al*, 1989; MARKOWITZ *et al*, 1980). A partir deste sítio outras áreas seriam contaminadas, seja por meio de processos endógenos ou exógenos.

Um processo endógeno que se coloca como hipótese para a ocorrência dessas infecções em indivíduos hospitalizados é a passagem de bactérias viáveis através da mucosa epitelial intestinal para a lâmina própria e daí para os linfonodos do mesentério (LNM) e, então, para outros tecidos. Segundo Berg & Garlington (1979), este processo define a translocação bacteriana (TB) através do epitélio intestinal e poderia explicar a ocorrência de um quadro clínico séptico em pacientes aonde não se detecta um foco infeccioso (BORDER *et al*, 1987). Alguns autores propõem que mesmo que não seja a fonte de infecção per se, a TB pode ter significância clínica contribuindo para a falência de múltiplos órgãos induzida pela sepse (WIEST & RATH 2003; MENCHACA-DIAZ, *et al*, 2005).

O estudo em modelos animais demonstra que vários fatores contribuem para a ocorrência de TB. Basicamente, estes fatores relacionam-se com disfunção ou depressão imunológica, quebra da integridade da barreira mucosa, ou desbalanço na microbiota local com sobre-crescimento de uma dada espécie bacteriana (BERG, 1983). Neste caso, a antibioticoterapia contribui uma vez que seleciona microrganismos endógenos resistentes que passam a predominar naquele sítio propiciando a ocorrência da TB (BERG, 1981; EPSTEIN *et al*, 1990).

A literatura mostra que, em modelo animal usando camundongos “germ-free” mono-inoculados por via intestinal, a *K. pneumoniae*, além de *Pseudomona aeruginosa*, *E. coli* e *Proteus mirabilis*, é um dos Gram negativos mais efetivos em translocar através do epitélio intestinal intacto (VAN DER WAAIJ *et al*, 1972;

STEFFEN *et al*, 1988). Ao contrário, os anaeróbios estritos são os que menos translocam, apesar de sua alta concentração nas fezes (10^{10} - 10^{11} por grama de fezes) (STEFFEN *et al*, 1988). Na verdade foi demonstrado que a eliminação de anaeróbios por antibioticoterapia contribui para o sobre-crescimento dos facultativos e para a sua translocação através do trato intestinal (ALVERDY *et al*, 2000).

O fato de as bactérias mais bem sucedidas na TB através do trato intestinal serem as mesmas que causam sepse em pacientes debilitados sugere a possibilidade de haver uma relação verdadeira entre TB e infecção sistêmica em indivíduos imunocomprometidos.

Alverdy *et al* (2000) diz que a sepse derivada do intestino ocorre quando o patógeno certo, contendo os genes de virulência certos, encontra o hospedeiro certo. Assim, foi demonstrado que as bactérias que mais aderem à mucosa são as que translocam mais eficientemente (LJUNGDAHL *et al*, 2000). MACUTKIEWICZ *et al* (2008) mostraram que a TB requer características bacterianas específicas para ocorrência do processo. Usando modelo de translocação com células Caco-2 polarizadas e cultivadas sobre membrana permeável, foi demonstrado que a capacidade de aderir à mucosa está diretamente relacionada à invasão celular e ocorrência de TB na ausência de disfunção das “tight junctions” (MACUTKIEWICZ *et al*, 2008). Cruz *et al* (1994), usando o mesmo modelo, mostrou que uma *E. coli* comensal fez TB passando intracelularmente e não entre as células, por um processo diverso da invasão celular dependente de beta-integrinas, fibronectina ou RGD. O processo foi inibido por D-manose, sugerindo o envolvimento de adesinas ou receptores celulares contendo este açúcar. Deitch *et al* (1988) mostraram invasão de *E. coli* em pontas de vilos ulcerados, após choque hemorrágico em modelo *in vivo*. Alexander *et al*. (1990) usando modelo de alça ileal exposta (alça de Thiry-

Vella) e visualização ao MET observou *E. coli* na borda em escova e também no interior de enterócitos, e sugeriu que essa passagem ocorre sempre através de células e nunca inter-células.

Embora Berg (1995) tenha sugerido que talvez não haja necessidade de adesinas para a ocorrência de TB, uma vez que partículas de látex também translocam para LNM e outros sítios (LE FEVRE *et al*, 1978), uma série de outras observações são contrárias a essa idéia. Dessa forma, não se observa na clínica uma correlação entre o aumento de permeabilidade intestinal, aumento de TB e aumento de complicações no quadro clínico (BROOKS *et al*, 1993; SEDMAN *et al*, 1994). Estudos *in vivo* também mostram ausência de correlação entre TB e aumento de permeabilidade intestinal para macromoléculas (O`BRIEN *et al*, 2002).

Em particular, com relação às infecções causadas por *K. pneumoniae*, dados epidemiológicos mostram que a infecção é precedida por colonização intestinal (DE CHAMPS *et al*, 1989; SELDEN, *et al*, 1971) sempre dependente de processos de adesão bacteriana (apud FYNLEY & FALKOW, 1989).

Foi comentado no início deste capítulo que o gênero *Klebsiella* possui algumas adesinas tanto fimbriais quanto afimbriais. No entanto, até o momento, apenas a CF29K e a KPF-28 são conhecidas como capazes de aderir *in vitro* a linhagens de células intestinais de origem humana como a Caco-2 e a Int-407 (DARFEUILLE-MICHAUD, *et al.*, 1992; FAVRE-BONTÉ *et al*, 1995). Todavia, não há demonstração de seu papel na patogenicidade de *K. pneumoniae* (LAWLOR *et al*, 2005; DI MARTINO *et al*, 2003). Tampouco há demonstração da capacidade de *K. pneumoniae* translocar por via intestinal em modelo animal imunologicamente competente e que não apresente lesão da barreira mucosa.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o envolvimento da adesina afimbrial CF29K no processo de translocação bacteriana por via intestinal por *Klebsiella pneumoniae*.

Como objetivos específicos:

- 1- comparar a capacidade de amostras isogênicas, com ou sem a adesina CF29K, de translocar *in vivo* usando modelo de TB por via intestinal em rato.
- 2- estudar a correlação entre TB e a presença de CF29K em um conjunto de amostras de *K. pneumoniae* isoladas de sangue e urina de pacientes hospitalizados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Amostras bacterianas – A amostra de *Klebsiella pneumoniae* CF504, portadora do plasmídeo pCFF14, de cerca de 150 Kpb que codifica a beta-lactamase de espectro ampliado CAZ-1/TEM-5 (CHANAL *et al*, 1988), foi isolada do sangue de um paciente internado na Unidade de tratamento intensivo (UTI) do Hospital de Clermont-Ferrand, na França. Essa amostra nos foi gentilmente cedida pelo Dr. George Jacoby (Lahey Clinic, Burlington-MA, USA). A amostra de *E. coli* K12 contendo o gene *cf29A* associado a marcas de resistência presentes no plasmídeo pTEM-5, foi cedida pela Dra. Ana Gales (DIPA-UNIFESP) e serviu como controle positivo nos experimentos de detecção e expressão do gene *cf29A*. As amostras de *E. coli* DH5 α (Bethesda Research Laboratories, 1986) e HB101 (SAMBROOK *et al*, 1989) foram utilizadas como receptoras em experimentos de transformação e como controles negativos nos diversos experimentos. A amostra *E. coli* DH5 α λ π foi utilizada como receptora do plasmídeo suicida recombinante pJP5603 (PENFOLD & PEMBERTON, 1992) contendo o fragmento *cf29A*₅₄₂ (fragmento de 542 pb interno ao gene *cf29A*) utilizado para a mutagênese do gene *cf29A* selvagem. Foram estudadas ainda 27 amostras de *K. pneumoniae*, isoladas do sangue (22 amostras) e da urina (5 amostras) de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de São Paulo, no período de janeiro de 1998 a Julho de 2001. Estas amostras foram gentilmente cedidas pela Dra. Ana Gales.

Todas as amostras empregadas neste estudo foram inicialmente purificadas por semeadura em agar MacConkey e uma colônia isolada, contendo as características morfológicas adequadas, foi submetida à confirmação da espécie por provas bioquímicas nos meios de EPM, MILI e Citrato de Simons (EWING, 1986; TOLEDO *et al*, 1982a e 1982b.)

3.2 - Estocagem das amostras bacterianas – As amostras foram mantidas em agar estoque (item 8.1) à temperatura ambiente, protegidas da luz. Um repique das amostras foi mantido a -20 °C em meio de caldo de soja tríptico (Tryptic Soy Broth - TSB), acrescido de 15% de glicerol esterilizado.

3.3 - Extração do DNA plasmidial – Foi realizada segundo o descrito por Birnboim & Doly (1979) com algumas modificações. As amostras foram semeadas em 3 mL de caldo TSB acrescido, quando necessário, de antibióticos para favorecer a seleção de células portadoras de plasmídeos. Após cultivo a 37 °C por 16-18h, uma alíquota de 1 mL foi centrifugada em microcentrífuga de rotação fixa de 12.000 rpm (Incibrás – Mod. Spin I - Instrumentação Científica Brasileira, São Paulo, Brasil) por três minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, o sedimento suspenso em 100 µL de solução I (item 8.2.1) e incubado por 30 minutos em banho de gelo. Adicionou-se então 200 µL da solução II (item 8.2.2), e após homogeneização manual, os tubos foram mantidos em gelo por sete minutos. Em seguida foram adicionados 150 µL da solução III (item 8.2.3), e a mistura incubada por, pelo menos, 1 h em banho de gelo. A mistura foi centrifugada em microcentrífuga por 10 min em temperatura ambiente. O DNA plasmidial presente no sobrenadante foi precipitado por adição de 2 V de etanol p.a. e incubação a -20 °C por 16-18 h, o sedimento foi ressuspenso em 100 µL de solução IV (item 8.2.4) e 200 µL de etanol gelado. Após nova incubação a -20 °C, por cerca de 1 h, e nova centrifugação, o DNA precipitado foi seco e ressuspenso em 15 µL de tampão Tris-EDTA (TE) (item 8.3).

3.4 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – para preparo do DNA-molde, cerca de 3 a 5 colônias crescidas em meio Agar Soja Trypticase (Tryptic Soy Agar - TSA) foram suspensas em 300 µL de água bidestilada estéril, submetidas à fervura por 10 min e mantidas congeladas até o momento do uso. Para detecção do gene *cf29A* foi utilizado o par de iniciadores: Direto -5'-TCA ACA ACA CTA TCA AGG AA-3', e Reverso -5'-ACC AAG TGC GTA AGA GGA-3' (Invitrogen, Califórnia - USA), desenhados segundo a seqüência depositada no GenBank, sob o no. U26208 (DI MARTINO *et al*, 1995). A mistura de reação consistia de: 5 µL de dNTPs 2 mM, 5 µL de Tampão de Reação 10X, 2 mM de MgCl₂, 5 µL de cada iniciador, 1 UN de DNA polimerase (Biotools – B&M Labs S.A., Espanha ou Invitrogen), 5 µL de DNA-molde, em volume final de 50 µL. O ciclo de amplificação utilizado foi: 94 °C por um minuto, 30X(94 °C por 30 seg, 48 °C por 30 seg e 72 °C por 60 seg), 72 °C por 7 min. A reação foi realizada em termociclador “Mastercycler gradient” (Eppendorf – USA). O amplicon obtido com esse par de iniciadores tem 572 pb (região entre as bases 243

a 814 da seqüência original). Alíquotas de 10 μ L foram utilizadas para realização de eletroforese em gel de agarose a 1,2%.

3.5 - Eletroforese de DNA em gel de agarose – Para visualização do DNA, alíquotas dos produtos de extração plasmidial, DNA plasmidial ou total digerido com enzimas de restrição, ou produtos de PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 0,8 %, 1 % ou 1,2%, dependendo da resolução da banda de interesse. As alíquotas de DNA foram adicionadas de 4 μ L de corante de corrida (item 8.4) em volume final de 20 μ L. A eletroforese foi realizada à 10 V/cm, em Tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X (TEB) (item 8.5). As bandas de DNA foram coradas com uma solução de Brometo de Etídeo a 5mg/mL em água, visualizadas em Transiluminador de luz Ultra Violeta (Bio Rad – USA) e fotografadas com filme Polaroid® 665. Todos os géis continham um padrão de peso molecular adequado [plasmídeos na forma CCC, extraídos da amostra 36R861 NCTCC (National Collection of Type Cultures, Londres, UK), DNA do fago lambda (λ) digerido com a enzima HindIII (Invitrogen), ou “1Kb DNA ladder” (Invitrogen)].

3.6 - Mutagênese do gene *cf29A* da amostra de *K. pneumoniae* Cf504 – Foi empregada a técnica de mutagênese não polar, sítio específica conforme descrito a seguir. Foi obtido um fragmento de 572 pb, interno ao gene *cf29A*, por PCR, conforme descrito no item 3.4. O fragmento foi purificado utilizando-se o sistema de purificação “Pure Link Quick gel extraction kit” (Invitrogen), e, em seguida clonado utilizando-se o sistema pGEM (Invitrogen), segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. O plasmídeo recombinante, pGEM*cf29A*₅₇₂, foi inserido na amostra de *E. coli* DH5 α tornada competente por tratamento com CaCl₂ (SAMBROOK *et al*, 1989). O DNA do clone pGEM*cf29A*₅₇₂ foi extraído conforme já descrito (item 3.3) e o fragmento contendo *cf29A*₅₇₂ foi recuperado por digestão com a enzima EcoRI (Invitrogen). Após eletroforese em gel de agarose (item 3.5), o fragmento EcoRI foi recuperado do gel como descrito acima. Esse fragmento foi então reclonado no vetor suicida pJP5603 (PENFOLD & PEMBERTON, 1992), linearizado com a enzima EcoRI, por meio de uma reação de ligação com T4 DNA ligase (Invitrogen). Essa ligação originou o clone pJP*cf29A*₅₇₂, portador da marca de resistência ao cloranfenicol. Como não seria possível usar essa marca para a seleção de

transformantes de *K. pneumoniae* CF504 (vide abaixo) foi necessário inserir no sítio HindIII do plasmídeo pJPCf29A₅₇₂, o cassete Ω de resistência a espectinomicina, presente no plasmídeo pHP45 Ω (PRENTKI & KRISCH, 1984). O fragmento Ω HindIII, de 2,0 Kpb, foi obtido por digestão de pHP45 Ω e purificado usando-se o sistema de purificação “Pure Link Quick gel extraction kit” (Invitrogen). Em seguida, o fragmento Ω HindIII foi ligado ao plasmídeo pJPCf29A₅₇₂ linearizado com HindIII, como descrito anteriormente. O plasmídeo recombinante pJP5603 Ω Cf29A₅₇₂ (contendo o fragmento interno de cf29A) foi inserido, por transformação pelo método de CaCl₂ (SAMBROOK *et al*, 1989), na amostra hospedeira DH5 α π , que permite a sua replicação por expressar a proteína lambda π (PENFOLD & PEMBERTON, 1992). Com a finalidade de gerar mutantes por inserção, o plasmídeo recombinante pJP Ω Cf29A₅₇₂, extraído e purificado como já descrito, foi inserido por transformação na amostra de *K. pneumoniae* CF504 selvagem. Os transformantes foram selecionados por cultivo em placa de MacConkey contendo 50 μ g/mL de espectinomicina. Um esquema representativo das etapas aqui descritas encontra-se na **Figura 6**, no capítulo de Resultados.

3.6.1 - Caracterização dos mutantes de *K. pneumoniae* CF504 para o gene cf29A.

3.6.1.1 - Por demonstração da inserção de pJP Ω Cf29A no gene cf29A - O plasmídeo pJP Ω Cf29A₅₇₂ não consegue replicar-se na amostra de *K. pneumoniae* CF504 porque esta não expressa a proteína lambda π da qual ele é dependente. Assim, transformantes resistentes à espectinomicina somente ocorrerão se, por recombinação homóloga, o plasmídeo pJP Ω Cf29A₅₇₂ inserir-se no gene selvagem cf29A. Essa inserção foi demonstrada através de uma reação de PCR utilizando os iniciadores: direto- 5`-GTT TTG CGG TAA TTC CGG AA-3` e reverso 5`-GTT CAG CGG AGC ACT CCA-3`, desenhados para este trabalho (seqüência do Genbank no. U26208) que amplificam o gene praticamente inteiro (entre as bases 1 e 892) e cujas seqüências são externas às do fragmento de 572 bp utilizado para recombinação homóloga (vide item 3.4). As condições de reação foram as mesmas descritas no item 3.4.

3.6.1.2 - Por demonstração de alteração no tamanho do fragmento de restrição portador do gene *cf29A* – Após extração do plasmídeo pCF504 selvagem e dos plasmídeos pCF504 recombinantes (item 3.3), os DNAs foram digeridos com a endonuclease de restrição EcoRI (Invitrogen), submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1 % (item 3.5) e transferidos para membranas de nitrocelulose (vide item 3.7.2). As membranas foram hibridadas com sonda para *cf29A*, conforme descrito nos itens 3.7.3 e 3.7.4.

3.6.1.3 - Por demonstração da não expressão da proteína CF29K – Foi feita extração de proteínas de superfície (item 3.8) das amostras de *K. pneumoniae* CF504 selvagem e recombinantes. Após resolução das bandas protéicas em gel de SDS-PAGE (item 3.9), este foi corado com “Coomassie brilliant blue”, ou então, foi utilizado para realização de “Western blot”. As membranas contendo as bandas protéicas foram incubadas com soro anti-CF29K (item 3.10) e reveladas conforme descrito no item 3.11.

3.7 - Detecção do gene *cfa29A*.

3.7.1 - por hibridação de colônias – As amostras bacterianas foram semeadas em placas de MacConkey Agar pelo método de placa-mestre. A placa mestre incluiu a amostra CF504 como controle positivo e as amostras de *E. coli* HB101 e DH5 α como controles negativos. Após crescimento a 37°C por 16-18 h, as colônias foram transferidas para papel de filtro 541 (Whatman International Ltd - England). Para isso, um filtro de papel Whatman, devidamente orientado, foi colocado sobre a placa mestre e incubado por 1 h a 37 °C. Em seguida, o filtro foi tratado para exposição do DNA bacteriano. O tratamento, à temperatura ambiente, consistiu de um banho em solução aquosa de SDS a 10%, por 1 min, seguido de solução de lise (item 8.6.1) por 5 min, solução de neutralização (item 8.6.2) por 5 min, e solução de SSC 2x (item 8.6.3) por 5 min. Após o tratamento, o filtro foi seco ao ar e protegido da luz e da umidade até o momento do uso.

3.7.2 - por “Southern blot” – Géis de agarose contendo o DNA obtido através de extração de plasmídeos, ou produto de reações de PCR, ou ainda, produto de digestões de DNA plasmidial ou DNA total com enzimas de restrição, foram tratados

com uma solução aquosa de HCl a 0,15 M por 10 min. Após uma rápida lavagem em água, os géis foram neutralizados com solução aquosa de NaOH a 0,4 N por 30 min. O DNA desnaturado foi transferido para membranas de nitrocelulose Hybond-ECL (Amersham / GE Healthcare – USA) por capilaridade (SAMBROOK *et al*, 1989) contra solução de NaOH a 0,4 N. As membranas foram lavadas por 15 min em solução de SSC 2X, repetindo-se a lavagem por duas vezes. Após secagem, as membranas foram mantidas secas e ao abrigo da luz até o momento do uso.

3.7.3 - Preparo da sonda de DNA marcada radioativamente – Foi utilizado como sonda o fragmento de 572 pb obtido por PCR como descrito anteriormente (item 3.4). Após eletroforese, a região do gel de agarose contendo o fragmento foi obtida e o DNA recuperado por eletroeluição em saco de diálise contendo tampão TBE 0,5X. O DNA obtido foi precipitado com 2V de etanol e 1/10 (V:V) de solução de acetato de sódio 3M pH 7,0 (item 8.7). Após centrifugação a 12.000 rpm por 10 min, o DNA sedimentado foi ressuspensão em 20 µL de TE (item 8.3) e mantido a -20 °C até o momento do uso. Cerca de 100 ng de DNA foram marcadas com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham), pelo método de “random primer”, utilizando-se o sistema de marcação radioativa “ready-to-go” (Amersham).

3.7.4 - Hibridação dos filtros – Os filtros obtidos como descrito nos itens 3.7.1 e 3.7.2 foram incubados com solução de hibridação (item 8.6.4) por, no mínimo, 1 h a 37 °C. Em seguida, foram transferidos para sacos plásticos apropriados, contendo 3 a 5 mL de solução de hibridação (item 8.6.4) por filtro e um volume de sonda correspondente a, aproximadamente, 10^6 cpm por mL. Após incubação por 16-18 h em forno de hibridação (Amersham) a 65 °C, os filtros foram lavados por 4X(20 min) com solução de SSC 2X (item 8.6.3) em temperatura ambiente, e secos ao ar. Os filtros secos foram expostos a filme Raio X (Kodak) por 16-18h, a -70 °C, em cassetes contendo telas intensificadoras. Após revelação, as áreas veladas do filme, correspondendo às colônias ou a bandas de DNA, indicavam um resultado de hibridação positivo.

3.8 - Extração de proteínas de superfície – Foi utilizada a metodologia para obtenção de preparados parcialmente purificados, descrita por Darfeuille-Michaud *et al* (1992), com pequenas modificações. As amostras em estudo foram semeadas

para obtenção de crescimento confluyente, em placas de 15X15 cm contendo meio Müeller-Hinton, e incubadas a 37°C, por 16-18 h. O crescimento obtido foi coletado em 5 mL de solução tampão salina-fosfato estéril (PBS) 0,1M pH 7.2 (item 8.8) e aquecido a 60 °C por 30 min, com leve agitação a cada 10 min. A preparação foi centrifugada a 11.000 rpm por 20 min a 4 °C, e o seu sobrenadante recuperado. As proteínas foram precipitadas por adição de 2 volumes de etanol a 95% e incubação, por 16-18 h a -20 °C. Após centrifugação a 11.000 rpm por 2 h a 4 °C, as proteínas precipitadas foram solubilizadas em 600 µL de água bidestilada estéril. A concentração de proteínas totais foi estimada pelo método de microdiluição de Bradford (1976).

3.9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e “Western blot” – Alíquotas de preparação protéica contendo cerca de 10 µg foram adicionadas de um tampão de amostra (item 8.9.1) na proporção de 1:4, fervidas por 5 min e submetidas a eletroforese em SDS-PAGE a 10% segundo Laemmli (1970). Em todo gel era aplicada uma alíquota de padrão de peso molecular (BenchMark protein ladder - Invitrogen). Após a corrida eletroforética, o gel destinado apenas à visualização do perfil de bandas protéicas foi corado com solução de “Coomassie brilhant blue R-250” (item 8.9.6). O gel destinado à técnica de “Western blot” foi submetido à transferência das bandas protéicas para membrana de nitrocelulose Hybond-C (Amersham). Para tanto, o conjunto de membrana e gel, envolvidos por papel de filtro comum, foi montado em uma cuba preenchida com tampão de transferência (item 8.10.1). Foi aplicada uma voltagem de 20-21 mV durante 16-18 h. Ao final do tempo de transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau (item 8.10.2) durante 5 min, para verificação da transferência das bandas protéicas. Após localização e marcação das bandas do padrão de peso molecular, a membrana foi descorada com água e submetida à reação com soro imune (“immuno-blot”) (item 3.11).

3.10 - Produção de soro anti proteína CF29K

3.10.1 – Obtenção da banda protéica de 29 KDa - As proteínas de superfície da amostra *K. pneumoniae* CF504 foram extraídas conforme descrito (item 3.8), resolvidas por eletroforese em gel de SDS-PAGE e coradas com Coomassie brilhant

blue (item 3.9). A banda protéica de 29 KDa foi localizada e recuperada do gel por eletroeluição (SAMBROOK *et al*, 1989).

3.10.2 – Imunização dos animais – Ratos Wistar EPM adultos, pesando cerca de 200g, foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de ketamine/xilasina 1:4, por injeção intramuscular de 100 µL/100g de peso. Foi feita uma coleta de 500 µL de sangue, por punção cardíaca, para obtenção de soro pré-imune. Em seguida, foi realizada anti-sepsia com álcool a 70% e uma incisão de cerca de 2-3 cm, no lado esquerdo do animal, logo abaixo da última costela, para expor o baço. Com auxílio de uma seringa de insulina, cerca de 50 µL da preparação protéica (item 3.10.1) foram inoculados sob a membrana que reveste o baço, e a incisão fechada por sutura em dois planos. Após um mínimo de 15 dias, e até 30 dias, após a inoculação, os animais foram anestesiados como descrito acima e o sangue foi coletado por punção cardíaca. Após coagulação do sangue, o soro foi separado por centrifugação e mantido a -20 °C até o momento do uso.

3.11 - Reação com soro imune – A membrana de nitrocelulose, contendo as bandas protéicas, foi bloqueada com tampão PBS-Tween contendo leite Molico® a 5% (item 8.12), por 2h à temperatura ambiente, com leve agitação. Após 3 lavagens de 5 min com tampão PBS-Tween (item 8.11), a membrana foi incubada por 1 h à temperatura ambiente, com leve agitação, no mesmo tampão contendo o soro imune diluído a 1:50. A membrana foi então lavada com tampão PBS-Tween (item 8.11) por 3 vezes de 15 min, à temperatura ambiente e com leve agitação. A reação foi revelada com uma solução de 4-cloro-alfa-naftol, segundo descrito por Darfeuille-Michaud *et al* (1992).

3.12 - Teste de interação com células eucarióticas mantidas “in vitro” – Foi estudada a interação com a linhagem celular Caco-2, originária de carcinoma de colon humano (PINTO *et al*, 1983) seguindo-se basicamente a metodologia descrita por Cravioto *et al* (1984).

3.12.1- Preparo de monocamadas celulares - Placas de 35 mm de diâmetro apropriadas para cultura de tecidos (Corning Inc., Corning, NY) foram semeadas com 1,5 mL de uma suspensão contendo cerca de 10⁵ células/mL em meio

essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Sigma). As células foram mantidas a 37 °C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, durante 48 h, tempo adequado para formação de uma monocamada celular incompleta.

3.12.2 - Realização do teste de interação – As amostras bacterianas a serem testadas foram cultivadas em 3 mL de meio TSB por 16-18 h a 37 °C. No momento do teste, foi preparada uma suspensão bacteriana na proporção de 1:10 em meio DMEM contendo 2% de SFB e 1% de D-manose (item 8.14). Um volume de 1,5 mL dessa suspensão bacteriana foi adicionado à monocamada celular, procedendo-se à incubação por 3 h a 37 °C. Em seguida, as monocamadas foram lavadas 10 vezes com PBS estéril (item 8.8).

3.12.3 - Visualização ao microscópio óptico - Os testes destinados à visualização ao microscópio óptico tiveram as monocamadas imediatamente fixadas por adição de 1,5 mL de metanol gelado. Após um mínimo de 30 min de fixação, as monocamadas foram lavadas com água corrente e submetidas à coloração por 10 min com solução de May-Grunwald (item 8.15) e 20 min com solução de Giemsa (item 8.16). Após lavagem em água corrente as monocamadas foram observadas ao microscópio óptico, utilizando-se objetiva de imersão.

3.12.4 - Quantificação das bactérias associadas às células eucarióticas – Os testes destinados à quantificação da interação bactéria-célula tiveram a monocamada celular descolada da superfície da placa pelo tratamento, por 5min à temperatura ambiente, com 400 µL de meio TSB contendo 1% de Triton X-100. Em seguida adicionou-se 1.600 µL de meio TSB, lavando-se a superfície da placa com o auxílio de uma micropipeta. Os 2 mL de meio TSB foram transferidos para um tubo de ensaio esterilizado, e diluições seriadas foram semeadas em meio de MacConkey para cálculo do número de bactérias associadas à monocamada celular.

3.13 - Teste de translocação bacteriana por via intestinal em ratos - A capacidade das bactérias transporem a barreira intestinal foi analisada através do teste de translocação bacteriana realizado em ratos, segundo método desenvolvido pelo Dr. Ivan H. J. Koh e descrito em Silva *et al* (2002).

3.13.1- Preparo dos animais – Foram utilizadas fêmeas adultas de ratos da linhagem Wistar-EPM, pesando entre 180g e 220g, procedentes do Biotério Central da UNIFESP-EPM. Os animais foram submetidos a um jejum pré-operatório de 24 h com água “ad libitum”.

3.13.2 - Preparo do inóculo bacteriano - Dois dias antes do teste, foram preparados 100 mL de cultivo bacteriano em caldo TSB com cerca de 18 h a 37 °C e aeração de 250 rpm (New Brunswick, New Jersey) a partir de pré-cultivos no mesmo meio. As células bacterianas foram sedimentadas por centrifugação a 6.000 rpm (centrífuga Sorvall RC2B e rotor G600) por 30 min a 4 °C. As bactérias foram ressuspensas em 1:10 do volume inicial com tampão PBS esterilizado (item 8.8). Uma alíquota de 100 µL dessa suspensão foi utilizada para preparo de uma diluição a 10⁻⁶ em tampão PBS que foi semeada em agar MacConkey para cálculo da concentração bacteriana. A partir deste cálculo a suspensão bacteriana foi ajustada para 10¹⁰ UFC/mL, exatamente. Durante as 24 h necessárias para realização desse procedimento, a suspensão bacteriana foi mantida a 4 °C. O mesmo procedimento de cálculo realizado imediatamente antes do teste mostrou que a manutenção da suspensão bacteriana em tampão PBS a 4 °C por 24 h não promoveu morte bacteriana significativa.

3.13.3 - Realização do teste de translocação bacteriana - Imediatamente antes do teste, os animais foram anestesiados por administração via intramuscular de 100 µL/100g de peso de uma mistura de cloridrato de Ketamina/Xilasina (4:1). Após anti-sepsia do abdome com álcool a 70 %, foi realizada laparotomia mediana, ligadura do íleo terminal, reparo da porção distal do duodeno e sondagem oroduodenal. Os animais foram inoculados, com auxílio de uma sonda, com 10 mL da suspensão bacteriana (item, 3.13.2), evitando-se o refluxo duodeno-gástrico. Em seguida, foi feita a ligadura do duodeno, remoção da sonda e sutura da parede abdominal em dois planos. O inóculo bacteriano foi deixado no lúmen intestinal por 2 h. Quando necessário, um reforço de anestésico foi administrado e, em seguida procedeu-se à reabertura da incisão abdominal e coleta asséptica dos seguintes materiais biológicos, pela ordem: excisão da cadeia de linfonodos do mesentério (LNM), baço e fígado. Cada material foi assepticamente pesado e exaustivamente macerado, com auxílio de um pistilo e cadinho de porcelana, previamente

esterilizados. Após suspensão do fígado em cinco mL, e dos demais órgãos em dois mL de solução fisiológica esterilizada, os materiais foram filtrados por meio de passagem em seringas de plástico contendo um plugue de gaze esterilizada. Alíquotas de 100 μ L dos filtrados foram então, semeadas em placas de agar MacConkey para contagem das bactérias viáveis. Em seguida procedeu-se ao cálculo do número de bactérias por grama de tecido.

4. RESULTADOS

4.1 – Perfil de plasmídeos da amostra *K. pneumoniae* CF504 – Como mostra a **Figura 1**, a amostra CF504 selvagem, expressando a proteína CF29K, possui 3 bandas de plasmídeos conforme descrito por Darfeuille-Michaud *et al* (1992).

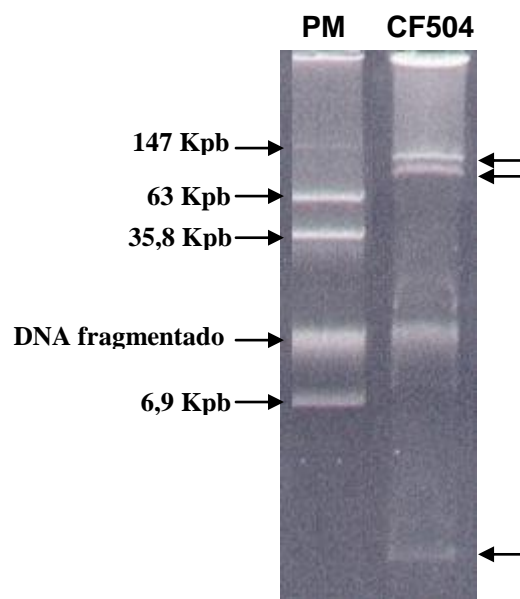


Figura 1 – Perfil plasmidial de *Klebsiella pneumoniae* CF504, com setas indicando a presença de três plasmídeos com pesos moleculares com cerca de 150, 100 e 5 Kpb. PM: amostra 36R861 (NCTC, Colindale, Londres). A zona de DNA fragmentado contém tanto fragmentos de DNA cromossomal quanto de DNA plasmidial.

4.2 - Detecção do gene *cf29A* na amostra KpnCF504 – Foi confirmada a presença do gene *cf29A* através da reação de PCR (item 3.4), que origina um amplicom de 572 pb compreendendo as posições 243 a 814 do gene que possui 953 bp no total (**Figura 2**).

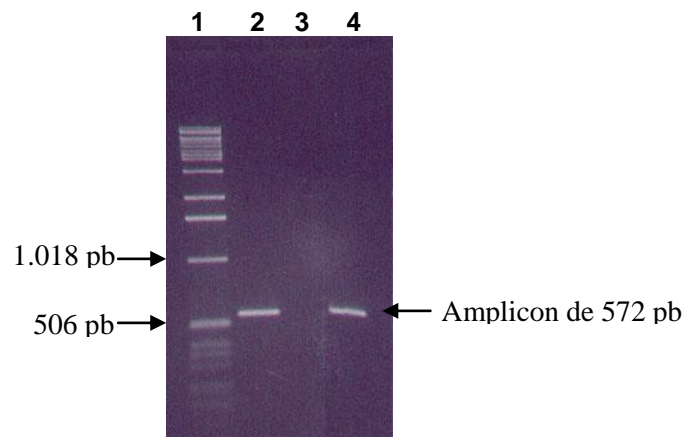


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos fragmentos de DNA amplificados por PCR. Canaletas: 1) padrão de PM 1 Kb DNA “ladder”, 2) *K. pneumoniae* CF504, 3) vazio, 4) *E.coli* pTEM-5.

O perfil de proteínas de superfície em gel de SDS-PAGE corado com Coomassie Brilliant Blue (**Figura 3**), mostra que *Klebsiella pneumoniae* CF504 apresenta uma banda protéica de, aproximadamente, 29 KDa. Essa banda protéica deve corresponder à adesina CF29K, uma vez que ela é comparável à banda expressa por *E. coli* HB101, portadora do plasmídeo pTEM-5 contendo o gene *cf29A*, utilizada como controle positivo. Conforme esperado, o controle negativo, *E. coli* HB101 sem plasmídeo, não expressa a banda de 29 KDa.

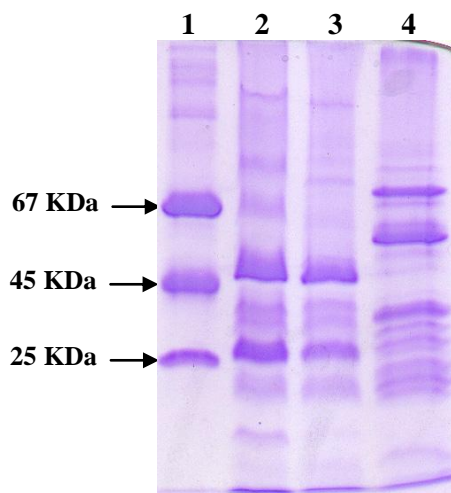


Figura 3. Extratos de proteínas de superfície resolvidos por SDS-PAGE a 10% e corados com Coomassie brilliant blue. Canaletas: 1) Padrão de peso molecular, 2) *K. pneumoniae* CF504, 3) *E. coli* K12 pTEM5 (controle positivo), 4) *E. coli* HB101 (controle negativo). A seta aponta a proteína de 29 KDa correspondente à CF29K.

4.3 – Capacidade de interação da KpnCF504 com células eucarióticas em cultivo –

A **Figura 4** ilustra o padrão de interação da amostra *K. pneumoniae* CF504 a células Caco-2. É possível observar intensa aderência com padrão difuso sobre a superfície das células.

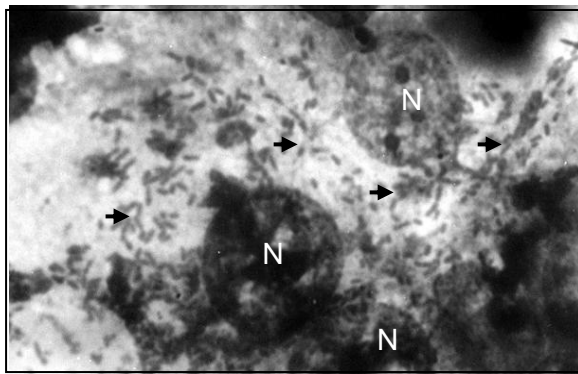


Figura 4. Interação de *K. pneumoniae* CF504 com células Caco-2 após 3 h de incubação. Observa-se um padrão difuso de aderência bacteriana (setas) sobre as células bacterianas. N=núcleo. Aumento 2.300X.

4.4 – Capacidade de translocação da amostra CF504 - Como mostra a **Tabela 1**, a *K. pneumoniae* CF504 foi capaz de translocar eficientemente, através do intestino, para os diversos órgãos, após 2 h de confinamento do inóculo bacteriano na luz do intestino delgado.

Tabela 1. Translocação por via intestinal de *K. pneumoniae* CF504

Amostra	No. (UFC ± DP) X 10 ³ por grama de tecido		
	LNM	Baço	Fígado
KpnCF504	20,56 ± 20,71	0,59 ± 0,55	0,11 ± 0,14
<i>E. coli</i> K12 pTEM5	0,04 ± 0,01	zero	zero
<i>E. coli</i> HB101	zero	zero	zero

Deve-se ressaltar que, embora com números bastante variáveis como denota o desvio padrão, todos os animais inoculados com a amostra CF504 apresentaram bactérias nos linfonodos do mesentério e no baço, e. apenas um animal não apresentou bactérias no fígado. Não foi observada translocação das amostras HB101 e *E. coli* K12 pTEM5 para qualquer dos órgãos analisados.

4.6 – Reatividade do soro anti-CF504 – O soro produzido em rato, utilizando como antígeno a banda protéica de 29 KDa extraída da amostra CF504 foi capaz de reconhecer a banda correspondente na amostras selvagem (**Figura 5**).

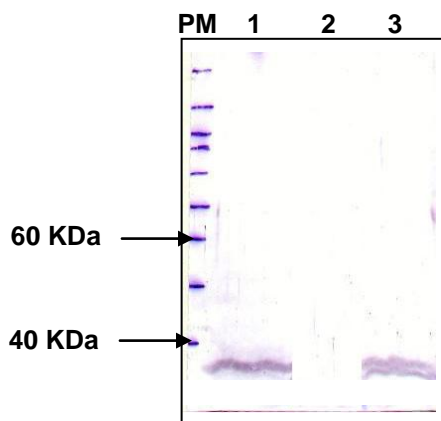


Figura 5 “Imunoblot” de extratos de proteínas de superfície realizado com o soro monoespecífico anti-banda CF29K extraída da amostra CF504. Canaletas: 1) padrão de peso molecular, 2) *K. pneumoniae* CF504, 3) *E. coli* HB101, 4) *E. coli* HB101 pTEM5. A seta indica a banda correspondente à proteína CF29K.

4.7 - Mutagênese sítio-dirigida do gene *cf29A* da amostra KpnCF504 – Para obtenção da amostra KpnCF504 mutante para o gene *cf29A* especificamente, foi utilizado o método de inserção intragênica por recombinação homóloga. Todas as etapas de manipulação genética realizadas estão esquematizadas na **Figura 6**. Inicialmente, um fragmento de 572 pb, interno ao gene *cf29A*, foi obtido por reação de PCR (item 3.4). O fragmento foi clonado no sistema “pGEM T easy” e reclonado no plasmídeo suicida pJP5603 portando o cassete Ω de resistência para espectinomicina. Essa construção deu origem ao recombinante suicida pJP Ω cf29a₅₇₂. O plasmídeo suicida recombinante possui as marcas de espectinomicina e canamicina ladeando o fragmento clonado conforme representado na **Figura 6**.

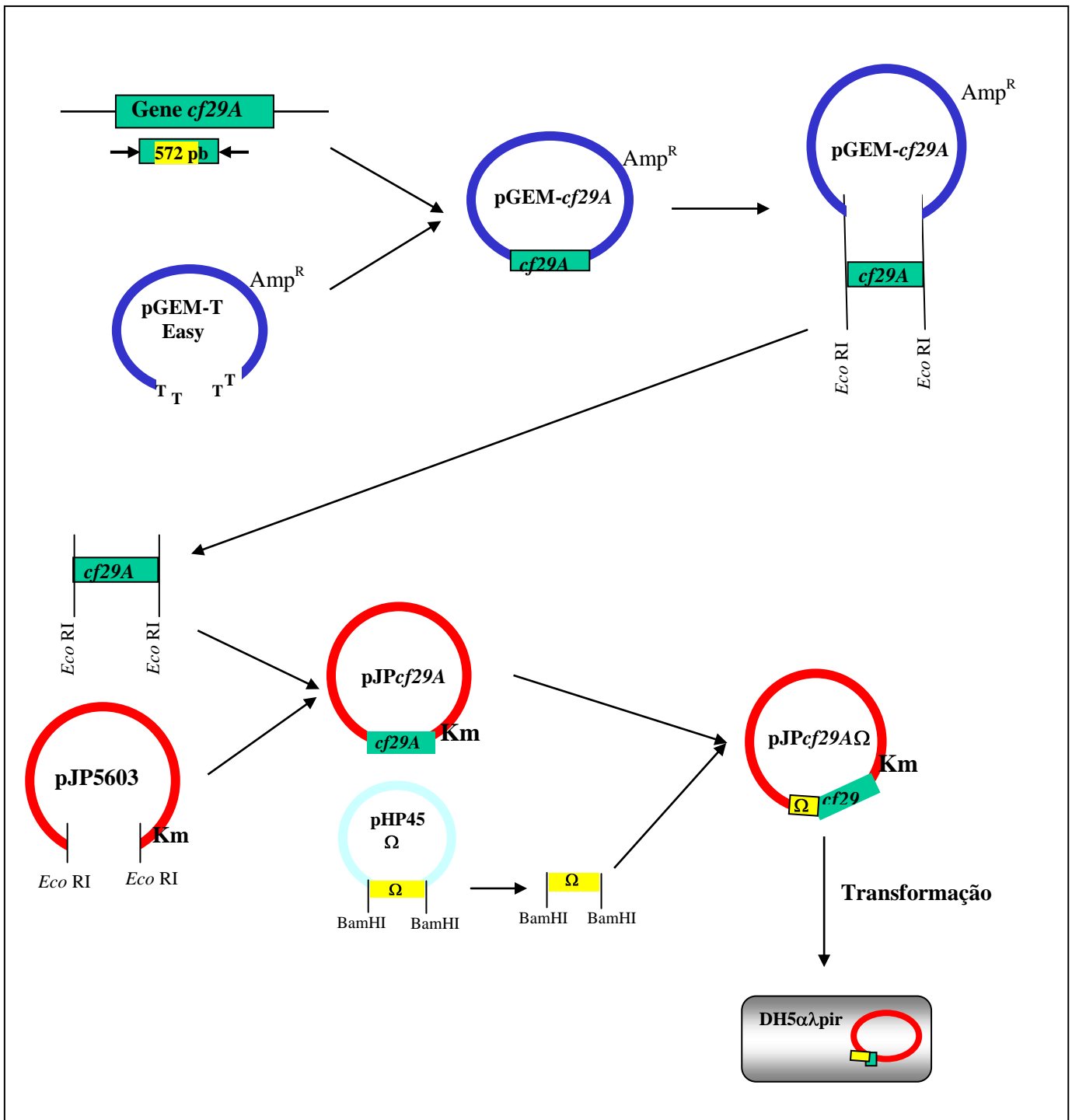


Figura 6. Esquema representativo das etapas de construção do plasmídeo recombinante suicida pJP5603 resistente a espectinomicina e portando o fragmento *cf29A*₅₇₂ interno ao gene *cf29A* selvagem (esquema modificado do original de Hernandes, R.T.).

Ao ser introduzido na amostra selvagem KpnCF504, o recombinante suicida não pode replicar-se autonomamente, pois sua replicação depende da presença da proteína $\lambda\pi$ não produzida pela amostra de *Klebsiella*. Entretanto, em algumas células ocorre o fenômeno de recombinação homóloga entre o gene *cf29A* selvagem e o fragmento de *cf29A*₅₇₂ clonado. O resultado desse evento é a inserção do fragmento e das marcas de resistência que o ladeiam no meio do gene *cf29A* selvagem, rompendo sua fase de leitura.

Assim, a semeadura da mistura de transformação em meio de MacConkey contendo espectinomicina, somente permitirá o crescimento de colônias de KpnCF504 que fizeram recombinação homóloga na região do gene *cf29A* e que, por consequência, apresentarão o gene selvagem mutado como mostra o esquema da **Figura 7**.

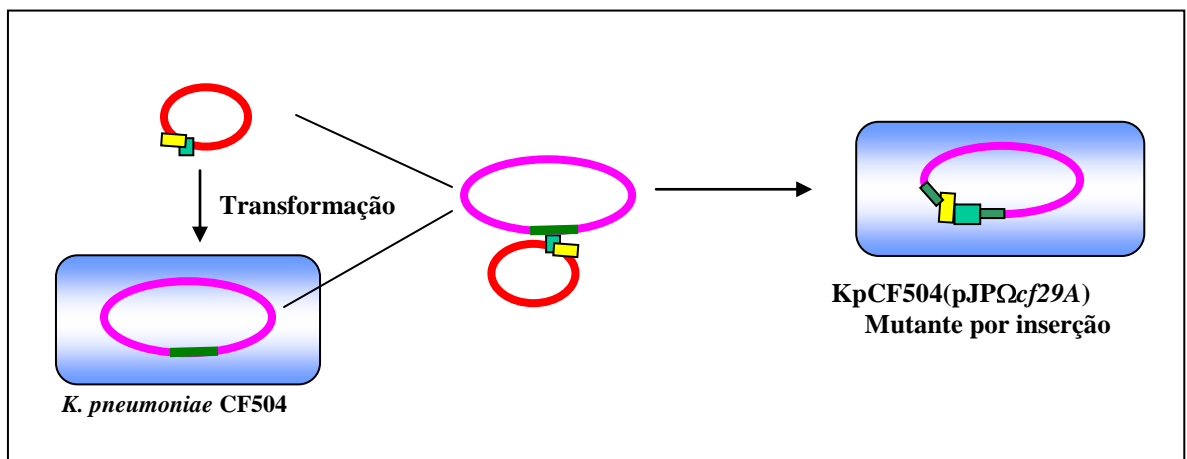


Figura 7. Esquema representativo da recombinação homóloga entre o plasmídeo pJPΩ*cf29A*₅₇₂ e o gene selvagem *cf29A*.

Uma forma de demonstrar a inserção do plasmídeo suicida é através da amplificação, por PCR, do gene *cf29A* com iniciadores que anelam em regiões externas ao fragmento de 572 pb utilizado para a mutagênese. A não ocorrência de amplificação, ou obtenção de um amplicom maior que o obtido com a amostra selvagem, denotam a ocorrência de inserção. Como mostra a **Figura 8**, não ocorreu amplificação da região contendo *cf29A* em várias colônias da amostra KpnCF504

Spec^R recombinante, sugerindo a ocorrência de inserção localizada de pJPΩ*cf29A*₅₇₂ e, portanto, mutagênese do gene *cf29A*.

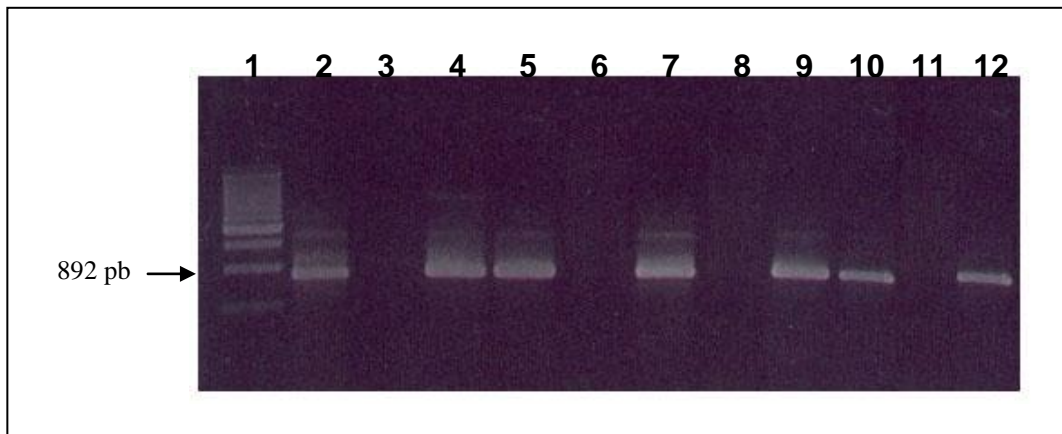


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos obtido por PCR com iniciadores homólogos às extremidades do gene *cf29A*. Canaletas: 1) Padrão de PM 1 Kb DNA ladder; 2, 12) *K. pneumoniae* CF504 selvagem; 3, 11) *E. coli* HB101; 4,5,7,9,10) CF504 recombinantes não mutantes para *cf29A*; 6,8) CF504 recombinantes mutantes para *cf29A*.

Pode-se demonstrar a ocorrência de inserção por uma forma direta, através da comprovação da alteração do tamanho de um fragmento contendo o gene *cf29A* mutado. A **Figura 9** mostra o resultado do “Southern-blot” realizado com o DNA total das amostras selvagem e mutantes R5 e R6, doravante denominadas MUT5 e MUT6, após digestão com a enzima *EcoRI*. Nota-se que o fragmento contendo o gene *cfa29a* nos mutantes é maior do que na amostra selvagem.

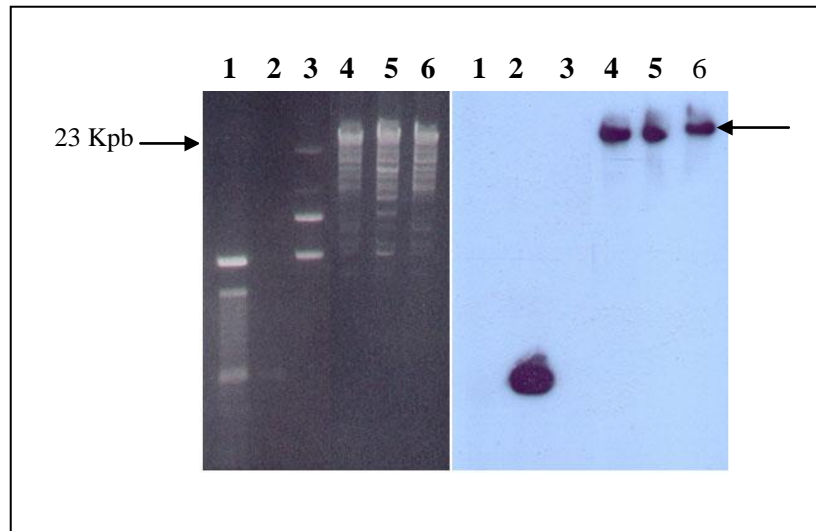


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % do DNA plasmidial digerido com EcoRI e sua hibridação com a sonda *cf29A* marcada radioativamente. Canaletas: 1 e 3) Controles negativos, 2) fragmento de *cf29a* obtido por PCR e utilizado como sonda (controle positivo), 4) *K. pneumoniae* CF504 selvagem, 5) CF504 recombinante MUT5, 6) CF504 recombinante MUT6. A seta aponta os fragmentos de DNA contendo o gene *cf29A*. Observa-se o aumento do tamanho do fragmento na amostra CF504 recombinante MUT6 enquanto ele não se alterou na amostra MUT5 em relação á selvagem.

Mutantes em *cf29A* não devem expressar a banda protéica de 29 KDa. Como pode ser visto na **Figura 10**, um ensaio de “imunoblot” utilizando o soro monoespecífico produzido a partir da proteína CF29K demonstrou que a amostra mutada MUT6 tornou-se incapaz de expressar uma banda protéica correspondente à adesina CF29K de 29 KDa presente na amostra *K. pneumoniae* CF504 selvagem. A amostra MUT5, embora tenha recebido a marca de Spec e, portanto, deve ser uma mutante por inserção, não teve o perfil de bandas protéicas alterado na região de interesse.

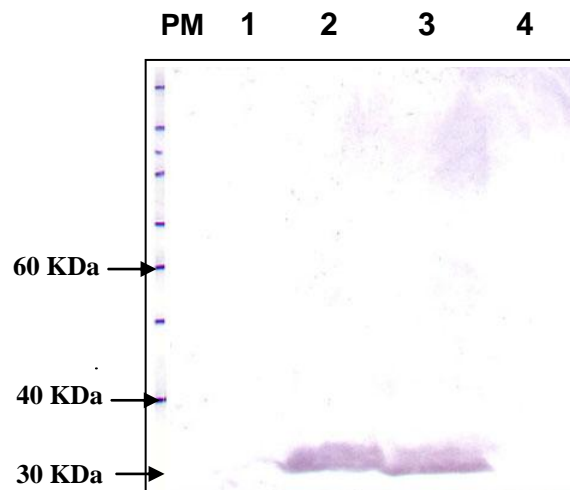


Figura 10. Imunoblot de extratos de proteínas de superfície obtidos de *K. pneumoniae* CF504 selvagem e das recombinantes contendo o pJPΩ*cf29A*₅₇₂, realizado com o soro monoespecífico anti-banda CF29K. Canaletas: 1) MUT6, 2) MUT5, 3) CF504 selvagem, 4) *E. coli* HB101.

4.8 - Interação das amostras mutantes com células Caco-2 – A Tabela 2 mostra os resultados dos testes quantitativos de interação com células Caco-2, realizados com a amostra *K. pneumoniae* CF504 e as recombinantes portadoras do pJPΩ*cf29A*₅₇₂, CF504 MUT5 e MUT6.

Tabela 2. Papel da adesina CF29K na interação de *K. pneumoniae* com células Caco-2

Amostra	Presença da adesina CF29K	Nº. de testes realizados	Nº. bactérias Aderidas*
KpnCF504	+	7	1,10 x 10 ⁶
KpnCF504-MUT5	+	8	1,25 x 10 ⁶
KpnCF504-MUT6	-	8	1,38 x 10 ⁶

* Média do resultado de 3 testes

Não houve diferença significativa entre os índices de interação da amostra selvagem e de qualquer das amostras recombinantes com células Caco-2. Este resultado mostra que a inserção do plasmídeo suicida recombinante pJPΩ*cf29A*₅₇₂ não interferiu per se com a capacidade de adesão de CF504 independente do seu local de inserção. Além disso, a inserção específica no gene *cf29A*, ocorrida em MUT6, também não resultou em alteração da adesão às células Caco-2.

4.9 - Capacidade de translocação bacteriana por via intestinal – A Tabela 3 mostra os resultados do teste de translocação, através do intestino, para diferentes sítios extra-intestinais, realizado em ratos, da amostra *K. pneumoniae* CF504 selvagem e da recombinante MUT6.

Embora o alto desvio padrão prejudique uma análise estatística, os resultados da **Tabela 3** sugerem que a ausência da proteína CF29K não interferiu na capacidade de *K. pneumoniae* CF504-MUT6 em translocar através da mucosa intestinal, para diversos sítios extra-intestinais, quando comparada com a amostra selvagem portadora da proteína. A manipulação genética utilizada para obtenção do mutante *K. pneumoniae* CF504-MUT6 também não parece ter sido responsável por esse resultado, pois uma amostra selvagem (*K. pneumoniae* A940), não portadora de CF29K, apresentou resultado semelhante.

TABELA 3. Índices de translocação bacteriana por via intestinal, em relação à presença da adesina CF29K

Amostra	Nº. de testes	Presença de CF29K	Número de bactérias recuperadas de:					
			LNM		FÍGADO		BAÇO	
			Nº./g ± DP x 10 ⁴	Pos. (%)	Nº./g ± DP x 10 ³	Pos. (%)	Nº./g ± DP x 10 ³	Pos. (%)
CF504	3	+	2,06 ±	100	0,11 ±	66,7	0,59 ±	100
A940	3	-	3,52 ±	100	0,15 ±	66,7	0,39 ±	100
CF504	2	-	1,91 ±	100	0,12 ±	100	0,52 ±	100

LNM = linfonodos do mesentério

Nº/g = número de bactérias por grama de tecido

DP = desvio padrão

Pos. = porcentagem de testes positivos

4.10 – Relação entre a capacidade de translocação e a presença da adesina CF29K em amostras de *Klebsiella pneumoniae* isoladas do sangue de pacientes - Foram estudadas 27 amostras de *K. pneumoniae* isoladas do sangue de indivíduos hospitalizados. A presença do gene *cf29A* nessas amostras foi avaliada por PCR e por hibridação de DNA.

Algumas amostras apresentaram duas bandas de DNA amplificadas por PCR não compatíveis com o amplicon esperado (**Figura 11A**), sugerindo a ocorrência de uma reação inespecífica. Para avaliar essa possibilidade foi realizada a hibridação dessas bandas de DNA com a sonda *cf29A*. Como se verifica na **Figura 11B**, não houve hibridação, confirmando que a reação de PCR nestes casos foi inespecífica.

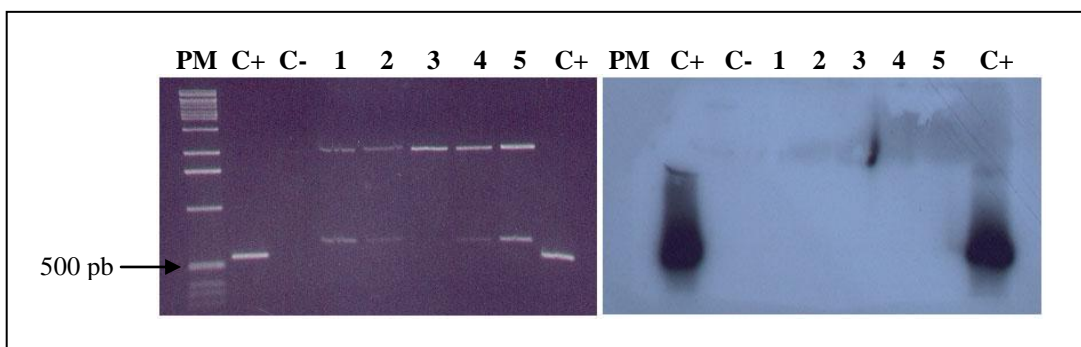


Figura 11A – Eletroforese em gel de agarose mostrando os fragmentos de DNA originados pela amplificação do gene *cf29A* por PCR. PM= padrão de peso molecular; C+ = controle positivo CF504; C- = controle negativo HB101; canaletas 1-5, amostras de *K. pneumoniae* nos. 136098, 136052, 161035, 121061 e 121012, respectivamente. **Figura 11B** - mesmo gel hibridado com a sonda de *cf29A* marcada radioativamente.

Esses resultados foram mais uma vez confirmados pelo teste de hibridação de colônias que se revelou negativo para todas as amostras clínicas em estudo (Figura 12).

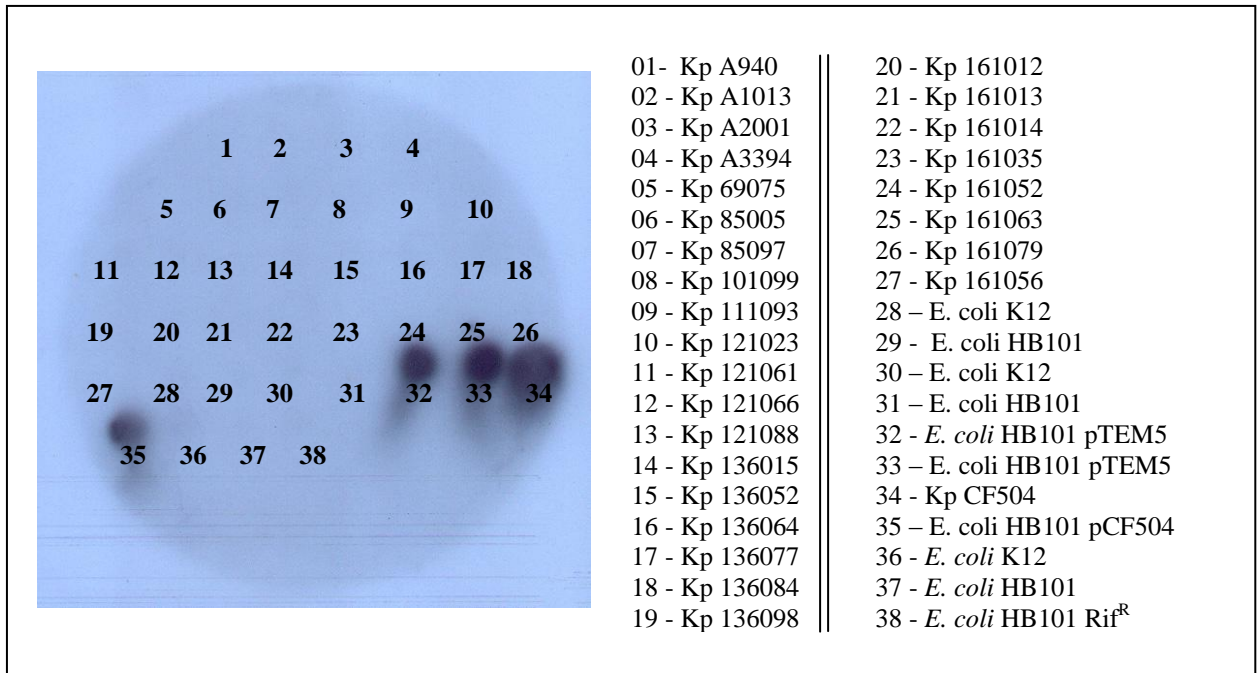


Figura 12. Hibridação de colônias com a sonda radioativa específica para detecção do gene *cf29A* em amostras clínicas de *K. pneumoniae*. Colônias de n^{os}: 1-27, amostras clínicas de *K. pneumoniae* (Kp); 28, 30, 36, *E. coli* K12 (controles negativo); 29, 31, 37, 38, *E. coli* HB101 (controle negativo); 32, 33, 35, *E. coli* HB101 portadora de plasmídeo contendo o gene *cf29A* (controle positivo); 34, *K. pneumoniae* CF504, amostra protótipo contendo o gene *cf29A* (controle positivo).

A capacidade de translocação de 15 dessas amostras foi ensaiada no modelo em rato como descrito anteriormente. Os resultados estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Correlação entre os resultados^a de translocação bacteriana e a presença da adesina CF29K em amostras de *K. pneumoniae* isoladas de material clínico^b

No. (UFC ± DP) X 10³ por grama de tecido				
Amostra/origem		LNM	Baço	Fígado
111093	sangue	0,13 ± 0,06	0,02 ± 0,03	0,02 ± 0,04
A1013	sangue	0,44 ± 0,01	0,14 ± 0,15	0,03 ± 0,04
42001	sangue	0,94 ± 0,50	0,12 ± 0,17	0,35 ± 0,10
136015	sangue	1,00 ± 0,13	0,07 ± 0,09	0,25 ± 0,36
136098	sangue	15,50 ± 3,53	zero	0,43 ± 0,61
85097	urina	23,50 ± 9,19	0,60 ± 0,84	0,83 ± 1,08
121023	urina	26,50 ± 0,70	zero	0,31 ± 0,01
A940	urina	50,90 ± 31,50	0,46 ± 0,61	0,22 ± 0,17
101099	sangue	60,60 ± 84,00	2,08 ± 2,71	0,45 ± 0,16
121066	sangue	120,25 ± 169,35	zero	0,03 ± 0,04
A3394	sangue	165,00 ± 7,00	0,14 ± 0,19	0,29 ± 0,35
136052	sangue	165,00 ± 7,07	0,09 ± 0,01	1,45 ± 0,35
121061	sangue	305,00 ± 148,49	0,33 ± 0,47	2,96 ± 4,00
85005	sangue	490,00 ± 70,71	0,44 ± 0,01	1,05 ± 0,07
69075	sangue	692,00 ± 859,80	1,20 ± 1,69	17,00 ± 23,90
<i>E. coli</i> HB101 ^c		zero	zero	zero
KpnCF504 ^d		20,56 ± 20,71	0,59 ± 0,55	0,11 ± 0,14

^a os dados representam a média do número de colônias ± DP por grama de tecido de três experimentos independentes

^b 12 amostras isoladas do sangue e 3 amostras isoladas de urina

^c controle negativo

^d amostra protótipo da adesina CF29K

Pode-se observar que, embora com eficiências diferentes, todas as amostras de origem clínica foram capazes de translocar por via intestinal, para os linfonodos do mesentério e fígado; e a grande maioria (12 em 15) das amostras alcançou o baço, da mesma forma que a amostra CF504, protótipo da adesina CF29K. O mesmo não ocorreu com a *E. coli* HB101, utilizada como controle negativo.

5. DISCUSSÃO

Apesar do enorme avanço no tratamento e prevenção das doenças infecciosas, estas continuam sendo um grande desafio para a comunidade científica e para os cuidadores de saúde em todo o mundo. Em particular as infecções causadas por bactérias Gram negativas que, em função de seus componentes estruturais, são capazes de induzir uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada levando, frequentemente, à instalação da sepse e falência de múltiplos órgãos, com alta incidência de óbitos. Os indivíduos mais predispostos a esta ameaça são pacientes hospitalizados de todas as idades que, além de sua doença de base, estão eventualmente expostos a tratamentos invasivos e antibioticoterapia, tornando-os susceptíveis à colonização por patógenos em potencial.

Em todo o mundo, *Klebsiella* spp. está entre as bactérias Gram negativas mais comumente implicadas nas infecções nosocomiais juntamente com *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (DARFEUILLE-MICHAUD *et al*, 1992; SADER, 2001; GALES *et al*, 1997; KIL *et al*, 2004; LINCOPAN *et al*, 2005; STEFFEN *et al*, 1988).

Entre as diversas espécies do gênero *Klebsiella* descritas, a *K. pneumoniae* é a mais freqüente causadora de surtos hospitalares de infecção em Unidades de Terapia Intensiva, podendo causar infecções urinárias (DI MARTINO *et al*, 1995), bacteremias e septicemias (DARFEUILLE-MICHAUD *et al*, 1992; DE CHAMPS *et al*, 1989; MARKOWITZ, *et al*, 1980), e outras lesões supurativas (DI MARTINO *et al*, 1995).

O uso amplo de antibióticos se, por um lado necessário, por outro lado tem contribuído para o aparecimento de cepas de *K. pneumoniae* extremamente resistentes com ênfase, a partir dos anos 80, para amostras produtoras de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBLs) (PETIT *et al*, 1988; SIROT *et al*, 1987). Para agravar a situação, detectou-se plasmídeos de alta massa molecular, conjugativos, carreadores de genes codificadores de ESBLs associados a genes envolvidos com a colonização do hospedeiro e, portanto, potenciais determinantes de virulência (DARFEUILLE-MICHAUD *et al*, 1992; DI MARTINO *et al*, 1996). Darfeuille-Michaud *et al* (1992) descreveu na amostra de *K. pneumoniae* CF504, um

destes plasmídeos, carreador de genes de resistência a diversos antimicrobianos, inclusive um codificador de ESBL do tipo CAZ-1/TEM-5, associados ao gene *cf29A*, responsável pela produção da proteína CF29K, promotora de adesão a células Caco-2, uma linhagem originada de carcinoma de colon humano (PINTO, *et al*, 1983).

Embora a *K. pneumoniae* possua outras adesinas já descritas como as fímbrias tipo 1 e tipo 3 (HORNICK *et al*, 1992), segundo aqueles autores, a CF29K foi a primeira adesina descrita como capaz de interagir com células epiteliais de origem intestinal. Posteriormente, os mesmos autores descreveram a proteína KPF-28, adesina também mediadora de interação com células epiteliais intestinais *in vitro* (DI MARTINO *et al*, 1996). Um material semelhante à cápsula, associado ao lipopolissacarídeo da parede celular, também foi descrito como mediador de adesão com o padrão agregativo em células Int-407 de origem intestinal humana (FAVRE-BONTÉ *et al*, 1995).

Entretanto, até o momento, não há estudos sobre o papel dessas adesinas na patogenicidade de *K. pneumoniae*. O interesse em estudá-las advém, em primeiro lugar, do fato de inúmeras pesquisas demonstrarem que as infecções hospitalares por *K. pneumoniae*, embora afetem sítios extra-intestinais, são precedidas de colonização intestinal (PODSCHUN & ULLMANN, 1998; DE CHAMPS *et al*, 1989; SELDEN, *et al*, 1971), provavelmente, mais ligada ao uso de antibióticos do que de falhas no cuidado dos pacientes (POLLACK *et al.*, 1972, ROSE & SCHREIER, 1968). Genes de virulência associados a genes de resistência a antimicrobianos seriam então co-selecionados, favorecendo a instalação de processos infecciosos a partir da colonização intestinal (LIVRELLI *et al*, 1996).

Há muito os quadros de sepse vêm sendo estudados no sentido de minimizar a alta taxa de morbidade e mortalidade que, além do custo humano, oneram sobremaneira os serviços de saúde. O fato de que, frequentemente, não se encontra nesses pacientes um foco infeccioso definido, levou grande parte da comunidade científica a considerar a hipótese de sepse de origem intestinal. Nesta hipótese, bactérias presentes na microbiota intestinal teriam acesso a sítios extra-intestinais por meio de um processo de translocação bacteriana (TB). Neste processo, tanto a bactéria viável como produtos bacterianos atravessariam a barreira mucosa alcançando a circulação sistêmica, e promovendo, direta ou indiretamente, a indução da síndrome da resposta inflamatória sistêmica, que poderia evoluir para falha das

funções vitais e, conseqüentemente, morte (KOH *et al*, 2006; BORDER *et al*, 1987; OFFENBARTL & BENGMARK, 1990, TANI *et al*, 1997). Vários trabalhos têm mostrado experimentalmente a ocorrência de TB (ALEXANDER *et al*, 1990; BERG, 1995; KOH & SILVA, 1996; MACUTKIEVICZ *et al*, 2008). Embora não haja comprovação de que TB seja a origem de infecção, não se podem descartar dados experimentais que apontam para sua contribuição no agravamento da sepse (MENCHACA-DIAZ *et al*, 2005).

Diversos autores demonstraram experimentalmente que a TB ocorre com a bactéria passando através dos enterócitos, atingindo a lâmina própria aonde deve ser internalizada pelas células fagocitárias, espalhando-se então para outros sítios extra-intestinais. Este modelo de translocação por via intestinal, o qual pressupõe a ocorrência de uma interação inicial entre o patógeno e o enterócito, foi demonstrado ocorrer tanto com *E. coli* quanto com a levedura *Cândida albicans* (ALEXANDER *et al*, 1990; WELLS *et al*, 1986).

A colonização das mucosas por bactérias é sempre ligada a processos de adesão mediados por uma proteína da superfície bacteriana que reconhece um receptor celular específico (GAASTRA & DE GRAAF, 1982; JONES & ISAACSON, 1983; FINLAY & FALKOW, 1989). Com relação á *K. pneumoniae*, embora não haja comprovação experimental definitiva, a adesão às membranas mucosas intestinais é considerada um passo necessário para o estabelecimento de infecções nosocomiais (FAVRE-BONTÉ *et al.*, 1995). Entretanto, até o momento, não temos conhecimento de estudos experimentais desenvolvidos em modelos *in vivo* que avaliem a capacidade de *K. pneumoniae* de translocar através da mucosa intestinal, nem tampouco o envolvimento de adesinas nesse processo.

Este trabalho investigou a capacidade da amostra protótipo *K. pneumoniae* CF504, portadora da adesina CF29K, em transpor a barreira intestinal, e avaliou o papel dessa adesina no processo de translocação bacteriana.

A amostra KpnCF504, aqui estudada, foi isolada da corrente sanguínea de um paciente hospitalizado em Clermont-Ferrand, França, em 1988, e é a amostra protótipo para a adesina CF29K. Este estudo confirmou as características dessa amostra, como a presença de um plasmídeo conjugativo portador de genes de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL), conferindo resistência a vários antimicrobianos, incluindo a ceftazidima, associados ao gene *cf29A*, aqui detectado por PCR. A expressão da adesina CF29K foi caracterizada em SDS-PAGE e

coloração por azul de Coomassie (vide **Figura 3**) e capacidade de aderir difusamente a células Caco-2 (vide **Figura 4**), como descrito por Darfeuille-Michaud *et al* (1992).

O ensaio de TB realizado em modelo *in vivo*, mostrou que a *K. pneumoniae* CF504 é capaz de translocar para linfonodos do mesentério, fígado e baço. Este achado é inédito na literatura e reveste-se de maior consistência na medida em que o modelo de TB empregado não expõe o animal a fatores que levam a dano da barreira intestinal. É preciso mencionar que muitos trabalhos experimentais sobre TB utilizam modelos que empregam animais “germ-free” (STEFFEN *et al*, 1988; VAN DER WAAIJ *et al*, 1972), ou de modelos cujo preparo induz a danos como: isquemia intestinal, com aumento da permeabilidade da barreira mucosa, lesão do epitélio, obstrução intestinal ou imunodepressão, fatores estes comprovadamente predisponentes da ocorrência de TB (apud WIEST & RATH, 2003). No modelo aqui utilizado não há dano físico da barreira intestinal, e o único fator relacionado à ocorrência de TB é a presença de monocultura bacteriana em alta concentração (cerca de 10^9 - 10^{10} por grama de peso do animal) mimetizando o que pode ocorrer com pacientes sob antibioticoterapia, passíveis de terem um desequilíbrio de sua microbiota e colonização por bactérias resistentes. Ainda mais no caso das infecções por *K. pneumoniae*, que parecem ser sempre precedidas de colonização intestinal e por cepas altamente resistentes (De CHAMPS *et al*, 1989; MARKOWITZ *et al*, 1980). Outro aspecto importante do modelo é o fato de a ocorrência de TB ser avaliada por detecção de bactérias viáveis nos diversos sítios extra-intestinais. Assim, o modelo de TB em questão permite uma avaliação mais fidedigna dos fatores bacterianos envolvidos tanto na interação com a mucosa intestinal quanto com as defesas do hospedeiro.

Outro dado importante possível de se constatar no modelo empregado é que as bactérias translocadas só são passíveis de serem detectadas se sobreviverem às defesas inatas do hospedeiro representadas por fatores como a resistência ao complemento presente no soro e resistência à fagocitose. Estes são atributos de virulência aferidos por este modelo e imprescindíveis para que um patógeno estabeleça uma infecção extra-intestinal por via hematogênica. De fato, já foi demonstrado (KOH & SILVA, 1996; SILVA *et al*, 1998) que amostras bacterianas sem estes atributos de virulência não são detectadas em modelos de TB, como é o caso de amostras laboratoriais não patogênicas como a *E. coli* HB101 e a *E. coli*

DH5 α . É importante ressaltar que muitos trabalhos tendem a aferir a TB apenas por detecção de bactérias nos LNM e, mais raramente, por outros métodos (apud BERG, 1995). Estes modelos podem não ser adequados, pois Berg (1995) refere a ocorrência fisiológica de TB, aonde bactérias comensais migram para os LNM mas aí não sobrevivem. Em 1987, Wells *et al.* reportaram a permanência de bactérias comensais nos LNM; entretanto esses autores não consideraram a possibilidade da presença de determinantes de virulência nessas amostras.

Para avaliar o papel da adesina CF29K, da amostra *K. pneumoniae* CF504, na translocação observada, optou-se por fazer uma mutagênese especificamente no gene *cf29A* dessa amostra. Para isso foi empregado o método de mutagênese sítio-dirigida utilizando o plasmídeo vetor suicida pJP5603. Este método tem sido empregado com sucesso por diversos autores para mutageneizar genes específicos (STEINER *et al*, 2000; HERNANDES *et al*, 2008; e mais de 100 citações até o momento). Neste método, Steiner *et al* (2000) mostraram que a recombinação homóloga do fragmento clonado com o gene alvo selvagem, leva à inserção de todo o plasmídeo suicida recombinante que rompe a fase de leitura do gene alvo e torna possível a seleção dos mutantes por meio de resistência à canamicina, marca presente no vetor (PENFOLD & PEMBERTON, 1992).

Neste trabalho, como a amostra CF504 já era resistente á canamicina, foi preciso inserir no vetor um cassete contendo o gene para resistência a espectinomicina que possibilitasse a seleção dos mutantes. Entre várias colônias recombinantes obtidas aquela designada MUT6 apresentou todas as características de um mutante no gene *cf29A*, a saber: 1) não teve o gene completo (cerca de 900 pb) amplificado por PCR, já que, em função da inserção, este deve ter aumentado para quase 4.000 pb (gene *cf29A* mais plasmídeo suicida recombinante) e não seria amplificado nas condições de reação empregadas; 2) mostrou a presença do gene mutado em um fragmento EcoRI maior do que na amostra selvagem, resultado da inserção do plasmídeo recombinante; e, finalmente, 3) não foi detectada a expressão da proteína CF29K por soro policlonal obtido em rato e produzido contra a banda protéica correspondente a CF29K obtida da amostra protótipo selvagem.

Uma outra colônia recombinante obtida, designada MUT5, não teve suas características alteradas, comportando-se nos três ensaios referidos acima, como a amostra CF504 selvagem. Isto se explica porque, provavelmente, neste caso, a inserção do plasmídeo vetor ocorreu por recombinação do gene de canamicina

presente tanto no vetor quanto na amostra selvagem, já comentado anteriormente. Este mutante foi importante para demonstrar nos experimentos subseqüentes que a presença do plasmídeo vetor per se, não interferiu em qualquer função de MUT6 que não estivesse diretamente ligada ao gene *cf29A*.

Uma vez caracterizado, o mutante MUT6 [*K. pneumoniae* CF504 (pJPΩ*cf29A*₅₇₂)] foi analisado quanto à sua capacidade de aderir a células *in vitro* e de translocar no modelo de TB *in vivo*. Inesperadamente, MUT6 manteve sua capacidade de aderir a células Caco-2 de forma tão eficiente quanto a amostra selvagem. Este fato pressupõe que, na ausência da adesina CF29K, outra(s) adesina(s) deva desempenhar este papel na amostra CF504 selvagem. O envolvimento de CF29K com a adesão de *K. pneumoniae* CF504 a células intestinais foi determinado por meio da clonagem do gene *cf29A* em *E. coli* DH5α (DI MARTINO *et al*, 1995). Darfeuille-Michaud *et al* (1992) reportou que o plasmídeo contendo *cf29A* também contém genes para outras adesinas, pois sua presença em *E. coli* K12 C600 torna-a aderente a várias linhagens celulares. Além disso, foi descrito por Di Martino *et al*, (1996) que muitas amostras clínicas de *K. pneumoniae* possuem uma outra adesina, denominada KPF-28, capaz de mediar a aderência a células de origem intestinal humana. Entretanto, não há descrição da presença de KPF-28 na amostra CF504. Finalmente, um estudo com 61 amostras clínicas de *K. pneumoniae* encontrou 26 aderentes a Caco-2 e que não possuíam CF29K ou KPF-28 (DI MARTINO, *et al*, 1997). Todos esses fatos reforçam a possibilidade da amostra CF504 conter outra(s) estrutura(s) que medeia a interação com células intestinais como sugerem os resultados aqui obtidos com o mutante MUT6.

No modelo de TB em rato, a amostra MUT6 translocou pela via intestinal, e disseminou-se para fígado e baço de forma tão eficiente quanto a amostra selvagem, apresentando apenas um número menor de células viáveis nos LNM, em comparação com a amostra selvagem. Estes resultados vêm de encontro aos estudos do grupo de Koh I. H. J (KOH *et al*, 1996; SILVA *et al*, 1996) que sugerem que a via linfática não seria a responsável pela disseminação da infecção, e sim um processo fisiológico envolvido na apresentação de antígenos ao sistema imunológico. Estes pesquisadores têm sugerido que a via hematogênica, pela veia Porta, seria o caminho seguido pelas bactérias translocadas para atingir outros sítios no organismo, tendo assim um papel significativo na infecção sistêmica (MENCHACA-DIAZ *et al*, 2005).

Assim, podemos supor que, embora a adesina CF29K não esteja envolvida com a translocação por via intestinal, é possível que tenha algum papel na sobrevivência da amostra CF504 nos linfonodos. Há necessidade de outros estudos para comprovar esta hipótese.

Klebsiella pneumoniae encontra-se entre as enterobactérias mais frequentemente isoladas da corrente sanguínea de indivíduos hospitalizados em todo o mundo (PODSCHUN & ULLMAN, 1998), inclusive no Brasil (LINCOPAN *et al*; 2005; SADER, 2001; GALES *et al*, 1997). Vários autores demonstraram que as infecções por *K. pneumoniae* nesses indivíduos são precedidas por colonização do trato intestinal e sugeriram que a origem endógena das infecções é mais provável do que outras possibilidades de veiculação, como por exemplo, procedimentos invasivos, ou contaminação de aparelhos, ou falha no cuidado dos pacientes (POLLAK *et al*, 1972; ROSE & SCHREIER, 1968). Neste caso é plausível considerar a TB como mecanismo para a origem endógena de infecções causadas por uma bactéria que invariavelmente aparece colonizando o trato intestinal. Não temos conhecimento de nenhum caso reportado de TB por *K. pneumoniae* em pacientes, entretanto Oishi *et al* (2008) responsabilizaram esse processo como causa de fasciite necrosante fatal por *K. oxytoca*, a segunda espécie desse gênero mais freqüente em infecções hospitalares.

Entretanto, até o momento, analisando o papel da adesina CF29K na amostra protótipo CF504, este trabalho demonstrou que, embora promova a interação bactéria-célula intestinal *in vitro*, como descrito por Darfeuille-Michaud *et al* (1992), essa adesina não tem papel no processo de TB avaliada no modelo *in vivo* aqui empregado. Isto nos levou a ampliar nossa pesquisa para amostras isoladas da corrente sanguínea de indivíduos hospitalizados, no sentido de correlacionar a sua capacidade de translocação com a presença da adesina CF29K.

A análise de 27 amostras clínicas de *K. pneumoniae* mostrou que o gene *cf29A* e, portanto, a adesina CF29K, são raros na amostragem estudada uma vez que nenhuma amostra positiva foi detectada. Embora essas amostras tenham sido isoladas em um período de três anos (entre Janeiro de 1998 e Dezembro de 2000) nas Unidades de Terapia Intensiva Geral e Neonatal do Hospital São Paulo, elas não fazem parte de um clone disseminado, pois foram isoladas e caracterizadas por Carmo-Filho *et al* (2008) como pertencentes a 10 ribotipos diferentes e, na sua maioria, apresentaram perfil plasmidial diverso.

Foi reportado por Di Martino *et al* (1995) que o gene *cf29A* está geneticamente ligado a uma ESBL do tipo TEM-5 (DARFEUILLE-MICHAUD *et al*, 1992). Além disso, esses genes são carregados por um plasmídeo de alta massa molecular (185 kb) conjugativo. Segundo Carmo-Filho *et al* (2008) todas as amostras clínicas aqui estudadas possuíam plasmídeos, mas apenas quatro de massa molecular próxima a 185 kb. Além disso, todas as amostras produziam ESBL, entretanto nenhuma produzia ESBL do tipo TEM-5 associado a *cf29A*. Estes dados corroboram nossos achados sobre a ausência de *cf29A* nas amostras estudadas. Além disso, eles apontam para a possibilidade de que ESBLs do tipo TEM-5 são raras ou inexistentes em nosso meio. Reforçando esta idéia encontram-se os dados obtidos por Santos (2008) que também não encontrou nenhuma amostra positiva para *cf29A* em 92 amostras isoladas do sangue de pacientes hospitalizados no HSP, no período de 2005 a 2006.

Os ensaios de 15 das 27 amostras clínicas, no modelo de translocação por via intestinal *in vivo*, revelaram que todas foram capazes de translocar, embora com eficiência variada. Além disso, todas as amostras possuíam atributos que lhes permitiram alcançar o fígado e o baço dos animais, após transpor a barreira intestinal.

Os dados experimentais deste trabalho, aliados aos dados da literatura mostram que a hipótese sobre a origem intestinal das infecções por *K. pneumoniae* através de um processo de translocação bacteriana, tem respaldo experimental.

O fato de as amostras clínicas não possuírem a adesina CF29K e, mesmo assim, serem capazes de translocar, confirma os dados experimentais obtidos com mutantes da amostra protótipo CF504 que demonstraram o não envolvimento dessa adesina na translocação bacteriana por via intestinal e no espalhamento da infecção para sítios extra-intestinais.

Como já foi comentado anteriormente, ainda há outras adesinas de *K. pneumoniae*, caracterizadas ou não, capazes de aderir a células de origem intestinal humana e, portanto, candidatas a serem as mediadoras da interação inicial entre a bactéria e a célula hospedeira para iniciar o processo de translocação por via intestinal. Este processo, ocorrendo em 100% das amostras aqui analisadas, em modelo *in vivo* sem dano da barreira intestinal, deve refletir um possível mecanismo de patogenicidade de *K. pneumoniae* envolvido, seja na instalação da infecção per se, seja no agravamento de quadros infecciosos sistêmicos já instalados.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

1. A amostra de *K. pneumoniae* CF504, protótipo da adesina CF29K, é capaz de translocar, por via intestinal, para a cadeia de linfonodos mesentéricos (LNM), fígado e baço de ratos adultos normais submetidos apenas à inoculação intraluminal de alta concentração bacteriana.

2. A mutagênese do gene *cf29a*, com conseqüente não expressão da adesina CF29K, não interfere com a aderência da amostra de *K. pneumoniae* CF504 a células Caco-2 de origem intestinal humana.

3. A ausência da adesina CF29K não interfere com a translocação da amostra protótipo *K. pneumoniae* CF504 por via intestinal em modelo *in vivo*.

4. A adesina CF504 é rara ou inexistente em amostras clínicas de *K. pneumoniae* isoladas do sangue e urina de pacientes internados em um Hospital de São Paulo, SP.

5. A ausência da adesina CF504 não interfere com a capacidade de translocação por via intestinal das amostras clínicas estudadas.

6. Embora seja uma das adesinas envolvidas com a interação de *K. pneumoniae* a células intestinais de origem humana, a CF504 não deve estar envolvida na interação bactéria-enterócito que resulta em translocação através do epitélio intacto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTI, S.; ALVAREZ, D.; MERINO, S.; CASADO, M. T.; VIVANCO, F.; TOMAS, J. M.; BENEDI, V. J. Analysis of complement C3 deposition and degradation on *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.**64: 4726-4732, 1996.
- ALBERTI, S.; MARQUES, G.; CAMPRUBI, S.; MERINO, S.; TOMAS, J. M.; VIVANCO, F.; BENEDI, V. J. C1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. **Infect. Immun.** 61:852–860, 1993.
- ALBESA, I.; BARBERIS, L. I.; PAJARO, M. C.; ERASO, A. J. Actividad hemolítica de *Klebsiella pneumoniae* sobre glóbulos rojos de conejo. **Rev. Latinoam. Microbiol.** 27:83–87, 1985a.
- ALBESA, I.; BARBERIS, L. I.; PAJARO, M. C.; FARNOCHI, M. C.; ERASO, A. J. A thiol-activated hemolysin in gram-negative bacteria. **Can. J. Microbiol.** 31:297–300, 1985b.
- ALEXANDER, J. W.; BOYCE, S. T.; BABCOCK, G. F.; GIANOTTI, L.; PECK, M. D.; DUNN, D. L.; PYLES, T.; CHILDRESS, C. P.; ASH, S. K. The process of microbial translocation. **Ann Surg.** 212:496-512, 1990.
- ALVERDY, J.; HOLBROOK, C.; ROCHA, F.; SEIDEN, L.; WU, R. L.; MUSCH, M.; CHANG, E.; OHMAN, D.; SUH, S. Gut-derived sepsis occurs when the right pathogen with the right virulence genes meets the right host: evidence for in vivo virulence expression in *Pseudomonas aeruginosa*. **Ann Surg.** 232: 480–489, 2000.
- BAGLEY, S. T.; SEIDLER, R. J.; TALBOT, H. W. J.; MORROW, J. E.. Isolation of *Klebsiellae* from within living wood. **Appl. Environ. Microbiol.** 36:178–185, 1978.
- BALISH, M. J.; JENSEN, J.; UEHLING, D. T. Bladder mucin: a scanning electron microscopy study in experimental cystitis. **J. Urol.** 128:1060-1063, 1982.
- BARBERIS, L. I.; ERASO, A. J.; PAJARO, M. C.; ALBESA, I. Molecular weight determination and partial characterization of *Klebsiella pneumoniae* hemolysins. **Can. J. Microbiol.** 32:884–888, 1986.
- BERG, R. D.; GARLINGTON, A. W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. **Infect. Immun.** 23:403-411, 1979.

BERG, R. D. Promotion of the translocation of enteric bacteria from the gastrointestinal tracts of mice by oral treatment with penicillin, clindamycin, or metronidazole. **Infect. Immun.** 33:854-861, 1981.

BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Trends in Microbiol.** 3:149-154, 1995.

BERG, R.D. The Intestinal Microflora in Health and Disease. In: HENTGES, D. (ed). Academic Press, pp. 333-352, 1983.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.** 7: 1513-1523. 1979.

BJÖRKSTÉN, B.; KAIJSER, B. Interaction of human serum and neutrophils with *Escherichia coli* strains: differences between strains isolated from urine of patients with pyelonephritis or asymptomatic bacteriuria. **Infect. Immun.** 22:308-311, 1978.

BORDER, J. R.; HASSET, J.; LADUCA, J.; SEIBEL, R.; STEINBERG, S.; MILLS, B.; LOSI, P.; BORDER, D. The gut origin septic states in blunt multiple trauma (ISS=40) in the ICU. **Ann. Surg.** 206:427-446, 1987.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254,1976.

BROOKS, S. G.; MAY, J.; SEDMAN, P.; TRING, I.; JOHNSTONE, D.; MITHCELL, C. J.; MACFIE, J. Translocation of enteric bacteria in humans. **Br. J. Surg.** 80: 901–902, 1993.

BROWN, C.; SEIDLER, R. J. Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. **Appl. Microbiol.** 25:900–904, 1973.

BRYAN, C. S.; REYNOLDS, K. L.; BRENNER, E. R. Analysis of 1,186 episodes of gram-negative bacteremia in non-university hospitals: the effects of antimicrobial therapy. **Rev. Infect. Dis.** 5:629–638, 1983.

BULLEN, J. J.; ROGERS, H. J.; GRIFFITHS, E. Role of iron in bacterial infection. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 80:1–35, 1978.

BURMØLLE, M.; BAHL, M. L.; JENSEN, L. B.; SØRENSEN, S. J.; HANSEN, L. H.Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in Enterobacteriaceae strains. **Microbiology**, 154:187–195, 2008.

CARMO-FILHO, J. R.; SILVA, R. M.; CASTANHEIRA, M.; TOGNIM, M. C. B.; GALES, A. C.; SADER, H. S. 2008. Prevalence and Genetic Characterization of *bla*CTX-M among *Klebsiella pneumoniae* Isolates Collected in an Intensive Care Unit in Brazil. **J. Chem.** 25:5-9, 2008.

CARPENTER, J. L. *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. **Rev. Infect. Dis.** 12:672-682, 1990.

CASEWELL, M. W.; PHILLIPS, I. Epidemiological patterns of *klebsiella* colonization and infection in an intensive care ward. **J. Hyg. Camb.** 80:295-300, 1978.

CASEWELL, M. W.; PHILLIPS, I. Hands as a route of transmission for *Klebsiella* species. **Br. Med. J.** 2:1315-1317, 1977.

CHANAL, C. M.; SIROT, D. L.; LABIA, R.; PETIT, A.; MORAND, A.; SIROT, J. L.; CLUZEL, R. A. Comparative study of a novel plasmid-mediated beta-lactamase, CAZ-2, and the CTX-1 and CAZ-1 enzymes conferring resistance to broad-spectrum cephalosporins. **Antimicrob. Agents Chemother.** 32:1660-1665, 1988.

CLEGG, S.; GERLACH, G. F. Enterobacterial fimbriae. **J. Bacteriol.** 169:934-938, 1987.

COOKE, E. M.; POOL, R.; BRAYSON, J. C.; EDMONDSON, A. S.; MUNRO, M. E.; SHINEBAUM, R. Further studies on the source of *Klebsiella aerogenes* in hospital patients. **J. Hyg. Camb.** 83:391-395, 1979.

CRAVIOTO, A.; GROSS, R. J.; SCOTLAND, S. M.; ROWE, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.** 3:95-99, 1979.

CRUZ, N.; XAVIER, A.; SPECIAN, R. D.; BERG, R. D.; DEITCH, E. A. Role of mucin, mannose, and beta-1 integrin receptors in *Escherichia coli* translocation across Caco-2 cell monolayers. **Shock** 2:121-126, 1994.

CRYZ, S. J.; FÜRER, E.; GERMANIER, R. Experimental *Klebsiella pneumoniae* burn wound sepsis: role of capsular polysaccharide. **Infect. Immun.** 43:440-441, 1984.

DARFEUILLE-MICHAUD, A.; JALLAT, C.; AUBEL, D.; SIROT, D.; RICH, C.; SIROT, J.; JOLY, B. R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections. **Infect. Immun.** 60:44-55, 1992.

DE CHAMPS, C., SAUVANT, M. P.; CHANAL, C.; SIROT, D.; GAZUI, N.; MALHURET, R.; BAGUET, J. C.; SIROT, J. Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum-beta-lactamase-producing members of the

family *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit. **J. Clin. Microbiol.** 27:2887-2890, 1989.

DE LORENZO, V.; MARTINEZ, J. L. Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 7:621-629, 1988.

DEITCH, E. A.; BRIDGES, W.; BAKER, J.; MA, J. W.; MA, L.; GRISHAM, M. B.; GRANGER, D. N.; SPECIAN, R. D.; BERG, R. Hemorrhagic shock-induced bacterial translocation is reduced by xanthine oxidase inhibition or inactivation. **Surgery** 104:191-198, 1988.

DI MARTINO, P.; BERTIN, Y.; GIRARDEAU, P.; LIVRELLI, V.; JOLY, B.; DARFEUILLE- MICHAUD, A. Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. **Infect. Immun.** 63:4336-4344, 1995.

DI MARTINO, P.; CAFFERINI, N.; JOLY, B.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. **Res. Microbiol.** 154:9-16, 2003.

DI MARTINO, P.; LIVRELLI, V.; SIROT, D.; JOLY, B.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. **Infect. Immun.** 64:2266-2273, 1996.

DI PERSIO, J. R.; DESHPANDE, L. M.; BIEDENBACH, D. J.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R.; JONES, R. N. Evolution and dissemination of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and molecular report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2003). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 51:1-7, 2005.

DUGGAN, J. M.; OLDFIELD, G. S.; GHOSH, H. K. Septicaemia as a hospital hazard. **J. Hosp. Infect.** 6:406-412, 1985.

EDBERG, S. C.; PISCITELLI, V.; CARTTER, M. Phenotypic characteristics of coliform and non-coliform bacteria from a public water supply compared with regional and national clinical species. **Appl. Environ. Microbiol.** 52:474-478, 1986.

EPSTEIN, M. D.; TCHERVENKOV, J. I.; ALEXANDER, J. W.; INOUE S.; KUROIWA, K.; JACOBS, P. Effect of intraluminal antibiotics on translocation of *Candida albicans* in burned guinea-pigs. **Burns** 16:105-108, 1990.

EWING, W. H. **Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae.** 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing Co, 1986.

FADER, R. C.; DAVIS, C. P. Effect of piliation on *Klebsiella pneumoniae* infection in rat bladders. **Infect. Immun.** 30:554-561, 1980.

FADER, R. C.; DAVIS, C. P. *Klebsiella pneumoniae*-induced experimental pyelitis: the effect of piliation on infectivity. **J. Urol.** 128:197-201, 1982.

FAVRE-BONTÉ, S.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; FORESTIER, C. Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human Intestine-407 cells. **Infect. Immun.** 63:1318-1328, 1995.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiol. Rev.** 53, 210-30, 1989.

FIRON, N.; OFEK, I.; SHARON, N. Carbohydrate-binding sites of the mannose-specific fimbrial lectins of enterobacteria. **Infect. Immun.** 43:1088-1090, 1984.

GAASTRA, W.; DE GRAAF, F. K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Microbiol. Rev.** 46:129-161, 1982.

GALES, A. C.; BOLMSTROM, A.; SAMPAIO, J.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases isolated in hospitals in Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.** 1:196-203, 1997.

GIRARDEAU, J. P.; DER VARTANIAN, M.; OLLIER, J. L.; CONTREPOIS, M. CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. **Infect. Immun.** 56:2180-2188, 1988.

GOTOFF, S. P. Sepsis in the newborn. In: KRUGMAN, S.; KATZ, S. L.; GERSHON, A. A.; WILFERT, C. M. (eds). **Infectious diseases of children.** (9th ed.) Mosby, Year Book, St. Louis, Mo, pp. 402-418, 1992.

GOWER, P. E.; TAYLOR, P. W.; KOUTSAIMANIS, K. G.; ROBERTS, A. P. Serum bactericidal activity in patients with upper and lower urinary tract infections. **Clin. Sci.** 43:13-22, 1972.

GRIFFITHS, E.; CHART, H.; STEVENSON, P. High-affinity iron uptake systems and bacterial virulence, p. 121-137. In J. A. Roth (ed.), *Virulence mechanisms of bacterial pathogens.* American Society for Microbiology, Washington, D.C, 1988.

GUARINO, A.; GUANDALINI, S.; ALESSIO, M.; GENTILE, F.; TARALLO, J.; CAPANO, G.; MIGLIAVACCA, M.; RUBINO, A. Characteristics and mechanism of action of a heat-stable enterotoxin produced by *Klebsiella pneumoniae* from infants with secretory diarrhea. **Pediatr. Res.** 25:514-518, 1989.

GUERIN, F.; LE BOUGUENEC, C.; GILGUIN, J.; HADDAD, F.; GOLDSTEIN, F. W. Bloody diarrhea caused by *Klebsiella pneumoniae* : a new mechanism of bacterial virulence ? **Clin. Infect. Dis.** 27:648-649, 1998.

HANSEN, D. S.; GOTTSCHAU, A.; KOLMOS, H. J. Epidemiology of *Klebsiella* bacteremia: a case control study using *Escherichia coli* bacteremia as control. **J. Hosp. Infect.** 38:119-132, 1998.

HERNANDES, R. T.; SILVA, R. M.; CARNEIRO, S. M.; SALVADOR, F. A.; FERNANDES, M. C.; PADOVAN, A. C.; YAMAMOTO, D.; MORTARA, R. A.; ELIAS, W. P.; BRIONES, M. R.; GOMES T. A. The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. **Cell. Microbiol.** 10:415-25, 2008.

HIGAKI, M.; CHIDA, T.; TAKANO, H.; NAKAYA, R. Cytotoxic component(s) of *Klebsiella oxytoca* on HEp-2 cells. **Microbiol. Immunol.** 34:147-151, 1990.

HIGHSMITH, A. K.; JARVIS, W. R. *Klebsiella pneumoniae*: selected virulence factors that contribute to pathogenicity. **Infect. Control** 6:75-77, 1985.

HORNICK, D. B.; ALLEN, B. L.; HORN, M. A.; CLEGG, S. 1992. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. **Infect. Immun.** 60:1577-1588, 1992.

HOSCHUTZKY, H.; NIMMICH, W.; LOTTSPREICH, F.; JANN, K. Isolation and characterization of the non-fimbrial adhesin NFA-4 from uropathogenic *Escherichia coli* 07:K98:H6. **Microb. Pathog.** 6:351-359, 1989.

JONES, G. W.; ISAACSON, R. E. Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. **Crit. Rev. Microbiol.** 10:229-260, 1983.

KABHA, K.; NISSIMOV, L.; ATHAMNA, A.; KEISARI, Y.; PAROLIS, H.; PAROLIS, L. A. S.; GRUE, R. M.; SCHLEPPER-SHAFFER, J.; EZEKOWITZ, A. R. B.; OHMAN, D. E.; OFEK, I. Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.** 63:847-852, 1995.

KIL, K. S.; DAROUICHE, R. O.; HULL, R. A.; MANSOURI, M. D. Identification of a *Klebsiella pneumoniae* strain associated with nosocomial urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.** 35:2370-2374, 2004.

KLIPSTEIN, F. A.; ENGERT, R. F. Immunological interrelationships between cholera toxin and the heat-labile and heat-stable enterotoxins of coliform bacteria. **Infect. Immun.** 18:110-117, 1977.

- KLIPSTEIN, F. A.; ENGERT, R. F.; HOUGHTEN, R. A. Immunological properties of purified *Klebsiella pneumoniae* heat-stable enterotoxin. **Infect. Immun.** 42:838-841, 1983.
- KOH, I. H. J.; SILVA, R. M. 1996. Novel in vitro small intestine graft model for study of bacterial translocation in the rat. **Transplant. Proc.** 28:2667-2668, 1996.
- KOH, I. H. J.; MONTERO, E. F.; KELLER, R., ABREU, M. C. G.; GOLDENBERG, S.; SILVA, R. M. Can the portal vein be a conduit for bacterial translocation ? **Transplant. Proc.** 28:2971-2972, 1996.
- KOH, I. H.; LIBERATORE, A. M.; MENCHACA-DIAZ, J. L.; RUIZ-SILVA, M.; VILELA-OLIVEIRA, L.; WATANABE, A. Y.; SALOMÃO, R.; FAGUNDES-NETO, U. Bacterial translocation, microcirculation injury and sepsis. **Endocr Metab Immune Dis. Drug Targets.** 6:143-50, 2006.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 22: 680-685,1970.
- LE FEVRE, M. E.; OLIVO, R.; VANDERHOFF, J. W.; JOEL, D. D. Accumulation of latex in Peyer's patches and its subsequent appearance in villi and mesenteric lymph nodes.**Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 159:298-302, 1978.
- LINCOPAN, N.; MCCULLOCH, J. A.; REINERT, C.; CASSETTARI, V. C.; GALES, A. C.; MAMIZUKA, E. M. First isolation of metallo-beta-lactamase producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **J. Clin. Microbiol.** 43:516-519, 2005.
- LIVRELLI, V.; CHAMPS, C.; DI MARTINO, P.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; FORESTIER, C.; JOLY, B. Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections., **J. Clin. Microbiol.** 34:1963-1969, 1996.
- LJUNGDAHL, M.; LUNDHOLM, M.; KATOULI, M.; RASMUSSEN, I.; ENGSTRAND, L.; HAGLUND, U. Bacterial translocation in experimental shock is dependent on the strains in the intestinal flora. **Scand. J. Gastroenterol.** 35: 389-397, 2000.
- MAAYAN, M. C.; OFEK, I.; MEDALIA, O.; ARONSON, M. Population shift in mannose-specific fimbriated phase of *Klebsiella pneumoniae* during experimental urinary tract infection in mice. **Infect. Immun.** 49:785-789, 1985.
- MACUTKIEWICZ, C.; CARLSON, G.; CLARK, E.; DOBRINDT, U.; ROBERTS, I.; WARHURST, G. Characterization of *Escherichia coli* strains involved in transcytosis across gut epithelial cells exposed to metabolic and inflammatory stress. **Microbes Infect.** 10:424-31, 2008.

MARKOWITZ, S. M.; VEAZEY, J. M.; MACRINO, F. L.; MAYHAIL, C. G.; LAMB, V. A. Sequential outbreaks of infection due to *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: implication of a conjugative R plasmid. **J. Infect. Dis.** 142:106-112, 1980.

MARONCLE, N.; BALESTRINO, D.; RICH, C.; FORESTIER, C., Identification of *Klebsiella pneumoniae* genes involved in intestinal colonization and adhesion using signature-tagged mutagenesis. **Infect. Immun.** 70:4729-4734, 2002.

MATSEN, J. M.; SPINDLER, J. A.; BLOSSER, R. O. Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. **Appl. Microbiol.** 28:672-678, 1974.

MENCHACA-DIAZ J. L.; SILVA, R. M.; VILELA-OLIVEIRA, L.; LIBERATORE, A. M. A.; TOMA, R. K.; WATANABE, A. Y.; BUCHELE, G. L.; FAGUNDES-NETO, U; MORAIS, M. B.; KOH, I. H. J. The gut mesenteric lymph during bacterial translocation carries factor (s) related to mortality in sepsis. **Critical Care** 9 (Suppl 2):S20, 2005.

MERINO, S.; CAMPRUBI, S.; ALBERTI, S.; BENEDI, V. J.; TOMAS, J. M. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. **Infect. Immun.** 60:2529-2535, 1992.

MINAMI, J.; KATAYAMA, S. I.; MATSUSHITA, O.; SAKAMOTO, H.; OKABE, A. Enterotoxic activity of *Klebsiella oxytoca* cytotoxin in rabbit intestinal loops. **Infect. Immun.** 62:172-177, 1994.

MONTGOMERIE, J. Z. Epidemiology of *Klebsiella* and hospital-associated infections. **Rev. Infect. Dis.** 1:736-753, 1979.

O'BRIEN, D. P.; NELSON, L. A.; KEMP, C. J.; WILLIAMS, J. L.; WANG, Q.; ERWIN, C. R.; HASSELGREN, P. O.; WARNER, B. W. Intestinal permeability and bacterial translocation are uncoupled after small bowel resection, **J. Ped. Surg.** 37:390-394, 2002.

OFEK, I.; KABHA, K.; ATHAMNA, A.; FRANKEL, G.; WOZNIAK, D. J.; HASTY, D. L.; OHMAN, E. Genetic exchange of determinants for capsular polysaccharide biosynthesis between *Klebsiella pneumoniae* strains expressing serotypes K2 and K21a. **Infect. Immun.** 61:4208-4216, 1993.

OFFENBARTL, K.; BENGMARK, S. Intraabdominal infections and gut origin sepsis. **World J. Surg.** 14:191-195, 1990.

OISHI, H.; KAGAWA, Y.; MITSUMIZO, S.; TASHIRO, Y.; KOBAYASHI, G.; UDO, K.; AOKI, S.; TAKAYANAGI, M.; NAGASAWA, Z.; ARAKI, K.; OHZA, N.; EGUCHI, Y.;

NAKASHIMA, M. A fatal case of necrotizing fasciitis due to bacterial translocation of *Klebsiella oxytoca*. **J. Infect. Chemother.** 14:62-65, 2008.

OLD, D. C.; TAVENDALE, A.; SENIOR, B. W. A comparative study of the type-3 fimbriae of *Klebsiella* species. **J. Med. Microbiol.** 20:203-214, 1985.

OLD, D. C.; ADEGBOLA, R. A. Antigenic relationships among type-3 fimbriae of Enterobacteriaceae revealed by immunoelectronmicroscopy. **J. Med. Microbiol.** 20:113-121, 1985.

OLLING, S. Sensitivity of gram-negative bacilli to the serum bactericidal activity: a marker of the host parasite relationship in acute and persisting infections. **Scand. J. Infect. Dis.** 10(Suppl.):1-40, 1977.

ØRSKOV, I. Genus – *Klebsiella*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology.** (vol. 1). The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md, pp. 461-465, 1984.

ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F. Serotyping of *Klebsiella*. **Meth. Microbiol.** 14:143-164, 1984.

OTMAN, J.; CAVASSIN, E. D.; PERUGINI, M. E.; VIDOTTO, M. C. An outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* species in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.** 23:8-9, 2002.

PENFOLD, R. J.; PEMBERTON, J. M. An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria. **Gene** 118:145–146, 1992.

PETIT, A.; SIROT, D.; CHANAL, C.; SIROT, J.; LABIA, R.; GERBAUD, G.; CLUZEL, R. Novel plasmid-mediated β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than to other broad-spectrum cephalosporins. **Antimicrob. Agents Chemother.** 32:626-630, 1988.

PINTO, M.; ROBINE-LEON, S.; APPAY, M. D.; KEDINGER, M.; TRIADOU, N.; DUSSAULX, E.; LACROIX, B.; SIMON-ASSMANN, P.; HAFFEN, K.; FOGH, J.; ZWEIBAUM, A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Biol. Cell,** 47:323-330, 1983.

PITTET, D.; LI, N.; WENZEL, R. P. Association of secondary and polymicrobial nosocomial bloodstream infections with higher mortality. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 12:813-819, 1993.

PODSCHUN, R.; HEINEKEN, P.; SONNTAG, H. G. Hemagglutinins and adherence properties to HeLa and Intestine 407 cells of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolates. **Zentbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. Ser. A** 263:585-593, 1987.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. **J. Med. Microbiol.** 36:250–254, 1992.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.** 11:589-603, 1998.

POLLACK, M.; CHARACHE, P.; NIEMANN, R. E.; JETT, M. P.; REIMHARDT, J. A.; HARDY, P. H. Jr. Factors influencing colonisation and antibiotic resistance patterns of gram-negative bacteria in hospital patients. **Lancet** 2(7779):668-671, 1972.

PRENTKI, P.; KRISCH, H. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. **Gene**, 29:303-313, 1984.

QAVI, A.; SEGAL-MAURER, S.; MARIANO, N.; URBAN, C.; ROSENBERG, C.; BURNS, J.; CHIANG, T.; MAURER, J.; RAHAL, J. J. Increased mortality associated with a clonal outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* : a case control-study. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.** 26: 63-68, 2005.

ROANTREE, R. J.; RANTZ, L. A. A study of the relationship of the normal bactericidal activity of human serum to bacterial infection. **J. Clin. Invest.** 39:72–81, 1960.

ROSE, H. D.; SCHREIER, J. The effect of hospitalization and antibiotic therapy on the gram-negative fecal flora. **Am. J. Med. Sci.** 255:228–236, 1968.

SADER, H. S. Pathogens frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Braz. J. Infect. Dis.** 5:200-214, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2^a. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, A. C. M. Presença de determinantes genéticos de virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em Enterobactérias isoladas de bacteremia humana. Relação entre a prevalência destes determinantes e a filogenia nas amostras de *E. coli* estudadas. Tese de Mestrado – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, 2008.

SEDMAN, P. C.; MACFIE, J.; SAGAR, P.; MITCHELL, C. J.; MAY, J.; MANCEY-JONES, B.; JOHNSTONE, D. The prevalence of gut translocation in humans. **Gastroenterol.** 107: 643-649, 1994.

SEIDLER, R. J.; KNITTEL, M. D.; BROWN, C. Potential pathogens in the environment: cultural reactions and nucleic acid studies on *Klebsiella pneumoniae* from clinical and environmental sources. **Appl. Microbiol.** 29:819-825, 1975.

SELDEN, R.; LEE, S.; WANG, W. L.; BENNETT, J. V.; EICKHOFF, T. C. Nosocomial *Klebsiella* infections: intestinal colonization as a reservoir. **Ann. Intern. Med.** 74:657-664, 1971.

SHANNON, K.; STAPLETON, P.; XIANG, X.; JOHNSON, A.; BEATTIE, H.; EL BAKRI, F.; COOKSON, B.; FRENCH, G. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing nosocomial outbreaks of infection in the United Kingdom. **J. Clin. Microbiol.** 36:3105-3110, 1998.

SILVA, R. M.; BUZZUTTI, F. Y.; SILIANO, P. R.; MENCHACA-DIAZ, J. L.; SIQUEIRA, A. F. R. S.; KOH, I. H. J. Bacterial translocation is dependent on bacterial plasmid-borne genetic determinants. **Transplant. Proc.** 34:999-1000, 2002.

SILVA, R. M.; KELLER, R.; MONTERO, E. F.; SILVA, M. H.; GOLDENBERG, S.; KOH, I. H. Role of Peyer's patch in bacterial translocation. **Transplant. Proc.** 28:2672-2673, 1996.

SILVA, R. M.; MONTERO, E. F. S.; FAGUNDES-NETO, U.; KOH, I. H. J. The role of the small bowel as a barrier for bacterial septic shock. **Transplant. Proc.** 30:2553-2554, 1998.

SIMOONS-SMIT, A. M.; VERWEIJ-VAN VUGHT, A. M. J. J.; MACLAREN, D. M. The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*. **J. Med. Microbiol.** 21:133-137, 1986.

SIROT, D.; SIROT, J.; LABIA, R.; MORAND, A.; COURVALIN, P.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; PERROUX, R.; CLUZEL, R. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel 1-lactamase. **J. Antimicrob. Chemother.** 20:323-334, 1987.

SMITH, R. F.; DAYTON, S. L.; CHIPPS, D. D.; BLASI, D. Intestinal carriage of *Klebsiella* and *Pseudomonas* in burned children and their comparative role in nosocomial infection. **Health Lab. Sci.** 10:173-179, 1973.

STEFFEN, E. K.; BERG, R. D.; DEITCH, E. A. Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. **J. Infect. Dis.** 157, 1032-1038, 1988.

STEINER, T. S.; NATARO, J. P.; POTEET-SMITH, C. E.; SMITH, J. A.; GUERRANT, R. L. Enterotoxigenic *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Clin. Invest.** 105:1769-1777, 2000.

SUERBAUM, S.; FRIEDRICH, S.; LEYING, H.; OPFERKUCH, W. Expression of capsular polysaccharide determines serum resistance in *Escherichia coli* K92. **Zentbl. Bakteriologie**. 281:146–157, 1994.

TANI, T., HANASAWA, K. ENDO, Y., KURUMI, Y., SHIOMI, H., KODAMA, M., KUSHIMA, R, HATTARI, T. Bacterial translocation as a cause of shock in humans : A report of two cases. **Surg. Today** 27:447-449, 1997.

TARKKANEN, A. M.; ALLEN, B.; WESTERLUND, B.; HOLTHÖFER, H.; KUUSELA, P.; RISTELI, L.; CLEGG, S.; KORHONEN, T. K. Type V collagen as target for type-3 fimbriae, enterobacterial adherence organelles. **Mol. Microbiol.** 4:1353-1361, 1990.

TARKKANEN, A.M.; VIRKOLA, R.; CLEGG, S.; KORHONEN, T. K. Binding of type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. **Infect. Immun.** 65:1546-1549, 1997.

TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. EPM - modificação do meio Rugai e Araújo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir de glucose, H₂S, uréase e triptofano desaminase. **Rev. Microbiol.** (São Paulo). 13: 309-315. 1982a.

TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. MILi – um meio para realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. **Rev. Microbiol.** (São Paulo). 13: 230-235. 1982b.

TOLTZIS, P.; DUL, M. J.; HOYEN, C.; SALVATOR, A.; WALSH, M.; ZETTS, L.; TOLTZIS, H. Molecular epidemiology of antibiotic-resistant gram-negative bacilli in a neonatal intensive care unit during a non-outbreak period. **Pediatrics.** 108:1143-1148, 2001.

TOMAS, J. M.; CAMPRUBI, S.; WILLIAMS, P. Surface exposure of the O-antigen in *Klebsiella pneumoniae* O1:K1 serotype strains. **Microb. Pathog.** 5:141–147, 1988.

VAN DER WAAIJ, D.; BERGHUIS-DE VRIES, J. M.; LEKKERKERK-VAN DER WEES, J. E. C. Colonization resistance of the digestive tract and spread of bacteria to the lymphatic organs in mice. **J. Hyg.** 70, 335-42, 1972.

VENEGAS, M. F.; NAVAS, E. L.; GAFFNEY, R. A.; DUNCAN, J. L.; ANDERSON, B. E.; SCHAEFFER, A. J. Binding of type 1-piliated *Escherichia coli* to vaginal mucus. **Infect. Immun.** 63:416-422, 1995.

WELLS, C. L.; MADDAUS, M. A.; REYNOLDS, C. M.; JECHOREK, R. P.; SIMMONS, R. L. Role of anaerobic flora in the translocation of aerobic and facultatively anaerobic intestinal bacteria. **Infect. Immun.** 55: 2689-2694, 1987.

WELLS, C. L.; ROTSTEIN, O. D.; PRUETT, T. L.; SIMMONS, R. L. Intestinal bacteria translocate into experimental intra-abdominal abscesses. **Arch. Surg.** 121:102-107, 1986.

WIEST, R.; RATH, H. C. Bacterial translocation in the gut. **Best Pract. & Res. Clin. Gastroent.** 17:397-425, 2003.

WILLIAMS, P.; TOMAS, J. M. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. **Rev. Med. Microbiol.** 1:196–204, 1990.

WILLIAMS, P.; LAMBERT, P. A.; BROWN, M. R. W.; JONES, R. J. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. **J. Gen. Microbiol.** 129:2181-2191, 1983.

WILLIAMS, P.; SMITH, M. A.; STEVENSON, P.; GRIFFITHS, E.; TOMAS, J. M. T. Novel aerobactin receptor in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Gen. Microbiol.** 135:3173-3181, 1989.

YINNON, A. M.; BUTNARU, A.; RAVEH, D.; JERASSY, Z.; RUDENSKY, B. *Klebsiella* bacteremia: community versus nosocomial infection. **QJM** 89:933-941, 1996.

ZIDKO A.C.M. (comunicação pessoal), 2008.

8. ANEXO - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados quando não especificada a procedência, foram de procedência Merck (MERCK S.A., Rio de Janeiro – Brasil), Sigma (Sigma Chemical company, St Louis – USA) ou Synth (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, São Paulo – Brasil). Os meios de cultivo para bactérias foram de procedência BD (Becton, Dickinson and Company – Sparks, MD, USA). Com exceção dos meios utilizados para cultivo bacteriano, todos os meios de cultivo e soluções foram preparados com água deionizada (MILI-Q®, Milipore). Quando utilizada, a esterilização por autoclavação realizou-se sempre a 121°C por 15 minutos. Meios e soluções não autoclaváveis foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm (Milipore Corporation, USA).

8.1 - Meio para armazenamento das culturas bacterianas

Caldo Nutriente	1 %
NaCl	0,8 %
Bacto-ágar	0,6 %

Os solutos foram dissolvidos em água destilada a quente, e, após dissolução completa, a mistura foi distribuída, em volumes de 3ml, em tubos de ensaio. A esterilização foi feita por autoclavação.

8.2 – Soluções para extração de DNA plasmidial

8.2.1 – Solução I (solução de lise)

Glicose	2 %
Lisozima	2 mg/mL
Solução de Trizma, pH 8,0	25 mM
Solução de EDTA pH 8,0	10 mM

A solução foi preparada em água bidestilada esterilizada, imediatamente antes da sua utilização, e mantida em banho de gelo.

8.2.2 – Solução II (solução desnaturante)

SDS	1 %
NaOH	0,2 N

A solução foi preparada, no momento do uso, com água bidestilada esterilizada, mantendo-se em temperatura ambiente.

8.2.3 – Solução III – Acetato de sódio a 3 M, pH 4,8 (solução neutralizante)

O Acetato de sódio foi dissolvido em água bidestilada e seu pH ajustado para 4,8 com ácido acético glacial. A solução foi esterilizada por autoclavação e mantida à temperatura ambiente.

8.2.4 – Solução IV - Acetato de sódio a 100 mM, pH 7,0

Acetato de sódio	100mM
Tris.HCl pH 8,0	25mM

O acetato de sódio foi diluído em água bidestilada e o pH foi corrigido para 7,0 com a solução de Tris.HCl pH 8,0. Após autoclavação, a solução foi armazenada à temperatura ambiente.

8.3 – Tampão Tris (10 mM) – EDTA (1 mM) – TE

Trizma base	10mM
Na ₂ EDTA	1mM

Diluiu-se o Trizma e o EDTA em água bidestilada, ajustando-se o pH para 8,0 com HCl fumegante. A solução foi esterilizada por autoclavação e armazenada a 4°C.

8.4 – Corante para corrida eletroforética de DNA

Azul de bromofenol	0,25 %
Xileno cianol	0,25 %
Ficoll Tipo 400	25 %

O Ficoll foi dissolvido por aquecimento em água bidestilada. Após o resfriamento, os corantes foram adicionados e homogeneizados até sua completa dissolução. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

8.5 – Tampão Tris-Borato-EDTA 5X (TBE 5X)

Trizma Base	54 g
Ácido Bórico cristalizado	27,5 g
Solução de EDTA 0,5 M pH 8,0	20 mL
Água bidestilada qsp	1 L

A solução foi esterilizada por autoclavação e diluída para uso com água bidestilada.

8.6 – Soluções para hibridação de DNA

8.6.1 – Solução desnaturante

NaOH	0,5 N
NaCl	1,5 M

A solução foi preparada no momento do uso, em água bidestilada.

8.6.2 – Solução de neutralização

NaCl	2 M
Solução de Tris.HCl pH 7,0	1 M

A solução foi preparada no momento do uso, em água bidestilada.

8.6.3 - Solução salina-citrato 20X (SSC-20X)

NaCl	175,3 g
Citrato de sódio	88,2 g
H ₂ O bidestilada	700 mL

Após a dissolução dos sais, o pH foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 10 N. O volume foi completado para 1 L e a solução foi esterilizada por autoclavação e mantida em ambiente. A solução foi diluída em água bidestilada no momento do uso, conforme necessário.

8.6.4 – Solução de Hibridação

SDS	0,1 %
SSC	5X
Solução de Denhardt (SAMBROOK, 1989)	2X
DNA de esperma de salmão (Sigma)	2 mg/mL

A solução foi preparada em água bidestilada, sendo que o DNA de esperma de salmão foi previamente desnaturado por 5 min em água fervente, e imediatamente resfriado em banho de gelo por 5 min. A solução foi armazenada a 4 °C.

Momentos antes da sua utilização, a solução foi aquecida em estufa a 60 °C para dissolução do precipitado.

8.7 – Solução de acetato de sódio 3M, pH 7,0

O Acetato de sódio foi dissolvido em água bidestilada. Após ajuste do pH para 7,0, com ácido acético glacial, a solução foi esterilizada por autoclavação e mantida em ambiente.

8.8 – Solução tampão salina-fosfato de Dulbecco-Vogt, 0,1M, pH 7,2

NaCl	0,8 %
KCl	0,02 %
Na ₂ HPO ₄	0,115 %
KH ₂ PO ₄	0,02 %

8.9 – Soluções para realização de eletroforese de proteínas em gel de agarose na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) e solução corante

8.9.1 – Solução tampão de amostra (4X)

Solução de Tris-HCl, 0,5 M, pH 6,8	50mM
Beta-mercaptoetanol	10mM
SDS	2%
Azul de bromofenol	0,2%
Glicerol	20%

Os componentes foram diluídos em água bidestilada sob agitação. A solução foi armazenada em frasco escuro, a 4 °C.

8.9.2 - Solução de acrilamida-bisacrilamida

N,N-metileno-bis-acrilamida	0,2 %
Acrilamida	29,8 %

Os reagentes foram dissolvidos em água bidestilada. A solução foi filtrada em papel filtro duplo e armazenada em frasco escuro, a 4 °C.

8.9.3 – Solução tampão Tris-HCl, pH 8,8

Trizma base	9,08 g
H ₂ O bidestilada q.s.p.	50 mL

O Trizma foi dissolvido em 40 mL de água e, após ajuste do pH com ácido clorídrico, o volume foi completado com água bidestilada. A solução foi esterilizada por autoclavação e armazenada a 4 °C.

8.9.4 – Solução tampão Tris-HCl, pH 6,8

Trizma base	3,25 g
H ₂ O bidestilada q.s.p.	50 mL

A solução foi preparada como descrito no item 8.9.3.

8.9.5 – Solução tampão de corrida

Trizma base	6,06g
Glicina	28,9g

O Trizma foi dissolvido em 100mL de água bidestilada, o pH ajustado para 8,3 e a glicina adicionada completando-se posteriormente o volume para 200 mL com água bidestilada. A solução foi esterilizada por filtração e armazenada em temperatura ambiente. No momento do uso foi diluída 10X em água bidestilada e acrescida de solução de SDS para uma concentração final de 0,1 %.

8.9.6 – Solução de “Coomassie brilliant blue – R-250”

Comassie Blue R-250	0,2%
Metanol	50%
Ácido acético	10%

Os componentes foram diluídos em água bidestilada e a solução armazenada em frasco escuro a 4°C.

8.10 – Soluções para realização do “Western-blot”

8.10.1 – Solução tampão de transferência

Trizma base	0,29 %
Glicina	1,44 %
Metanol	20 %

Os componentes foram dissolvidos em água bidestilada. Após filtração em papel filtro, a solução foi armazenada a 4 °C.

8.10.2 – Solução corante de Ponceau

Ponceau	0,5 %
Ácido acético	1 %

O Ponceau foi dissolvido em água bidestilada esterilizada e, em seguida, acrescentou-se o ácido acético. A solução foi filtrada em papel filtro e armazenada em frasco escuro, a temperatura ambiente.

8.11 – Solução tampão PBS-Tween (PBS-T), 0,1 M, pH 7,4

O Tween 20 era adicionado ao tampão PBS (item 8.8), na concentração final de 0,5 %, no momento do uso.

8.12 – Solução tampão PBS-Tween – Leite Molico® a 5 %

Acrescentou-se ao PBS-T (item 8.11), leite desnatado Molico® a 5 %, no momento do uso.

8.13 – Meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco para cultivo de células Caco-2.

O meio foi hidratado com água Milli-Q® (Millipore) e seu pH ajustado para 7,2 com solução de bicarbonato de sódio 7,5%. Após esterilização por filtração, adicionado 40 UI de penicilina G potássica e 0,5% de L-glutamina. O meio foi armazenado a 4 °C até o momento do uso.

8.14 – Solução de D-manose a 10%

A D-manose foi dissolvida em água destilada e esterilizada em vapor fluente por uma hora, sendo armazenada a 4 °C até o momento do uso.

8.15 – Solução corante de May-Grunwald

8.15.1 – Solução tampão de Sørensen a 0,33M

KHPO ₄	0,45%
Na ₂ HPO ₄	0,18%

Os sais foram dissolvidos em água bidestilada, o pH ajustado para 7,3 e a solução esterilizada por autoclavação. Para uso o tampão foi diluído 1:2 em água bidestilada.

8.15.2 – Solução de eosina-azul de metileno segundo May-Grunwald

O corante foi preparado no momento do uso, diluindo-se a 1:2 em tampão de Sørensen 1:2 e filtrando-se em papel filtro.

8.16 – Solução de Azul-eosina de metileno segundo Giemsa

O corante foi preparado no momento do uso, diluindo-se a 1:3 em tampão de Sørensen 1:2 e filtrando-se em papel filtro.
