

_ Sequenciação Total do Genoma aplicada ao estudo de caracterização de uma estirpe de *Klebsiella pneumoniae* isolada de pus de drenagem de abscesso hepático

Maria João Simões¹, Aida Pereira², João Carlos Rodrigues¹, Tiago Pertucci², Inês Maury², Frederico E. Santo², Vítor Borges¹, João Paulo Gomes¹

j.paulo.gomes@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Serviço de Doenças Infecciosas. Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte.

_ Introdução

Klebsiella pneumoniae é um bacilo de Gram negativo, capsulado, da família *Enterobacteriaceae*, ubiqüitária no ambiente e que pode colonizar o Homem e outros animais. É um patógeno responsável por pneumonia adquirida na comunidade, particularmente em indivíduos alcoólicos (1) e por infeções urinárias. Contudo, a grande maioria das infeções ocorre em meio hospitalar, em doentes imunocomprometidos com co-morbilidades graves como diabetes mellitus ou obstrução pulmonar crónica (2). Em meados da década de 80 emergiu uma estirpe hiper-virulenta de *K. pneumoniae*, primeiramente identificada em Taiwan (em 1985) e na Coreia, e posteriormente dispersa por outros países do sudeste asiático, tipicamente associada a abscesso hepático adquirido na comunidade (3, 4). Atualmente esta é a etiologia mais frequente de abscesso hepático, considerada endémica em Taiwan e na Coreia e emergente em várias regiões do globo (5).

A estirpe hiper-virulenta de *K. pneumoniae* associada a abscesso hepático na comunidade apresenta uma típica hiper-mucoviscosidade em cultura em meio sólido, estando normalmente associada ao serotipo capsular K1 (menos frequentemente K2), à sequência tipo (ST) 23 e, entre outros, pode possuir fatores de virulência tais como os codificados pelos genes *rmpA* (*regulator of the mucoid phenotype*) e *magA* (*mucoviscosity associated gene A*) (6, 7) e o sideróforo aerobactina (8, 9).

_ Objetivo

O presente estudo teve como objetivo o completo esclarecimento de um caso de abscesso hepático adquirido na comunidade, tendo para tal sido solicitada aos laboratórios do Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) a caracterização de uma estirpe de *K. pneumoniae* isolada do pus de drenagem, de uma doente internada num hospital da região de Lisboa.

_ Material e métodos

A estirpe de *K. pneumoniae* foi isolada em meio sólido no laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Santa Maria, e enviada para o INSA para posterior caracterização genética. Após extração do DNA, procedeu-se à Sequenciação Total do Genoma (*Whole Genome Sequencing* – WGS) no equipamento MiSeq (Illumina), usando uma profundidade de cobertura média superior a 70 vezes. Para a montagem bioinformática do genoma recorreu-se ao software Velvet. A sequência do genoma foi posteriormente analisada com vista: i) à determinação *in silico* da ST, usando o esquema de “Multilocus sequence typing” (MLST) gerido pelo Instituto Pasteur (França) (<http://bigsdb.web.pasteur.fr/>); ii) à previsão *in silico* do tipo capsular, tirando partido de um método de genotipagem *wzc* descrito recentemente (10); e iii) à pesquisa de fatores de virulência normalmente associados às estirpes de *K. pneumoniae* causadoras de abscesso hepático. O estudo de diferenciação fenotípica de subpopulações de *K. pneumoniae* foi realizado no INSA com base na hiper-mucoviscosidade das colónias reisoladas em meio de gelose de sangue, avaliada pela técnica de formação de filamento.

_ Resultados e discussão

A estirpe recebida no INSA apresentava-se em cultura pura em meio de Macconkey, com hiper-mucoviscosidade. Os resultados de WGS confirmaram, como esperado, tratar-se de uma estirpe de *K. pneumoniae*. A análise bioinformática da sequência do genoma permitiu caracterizar a estirpe como pertencente ao ST23 e

com provável serótipo capsular K1, e identificar também múltiplos fatores de virulência. Estas características permitem inferir que a estirpe em estudo se assemelha geneticamente aos clones virulentos de *K. pneumoniae* normalmente associados ao abscesso hepático (4, 9). Dados preliminares da previsão *in silico* de genes associados à resistência a antibióticos identificaram os genes que codificam as bombas de efluxo OqxAB (11), as quais se associam à diminuição da susceptibilidade às quinolonas. Curiosamente, os resultados de WGS sugeriram ainda não se tratar de uma cultura pura, mas sim de uma mistura de clones de *K. pneumoniae*.

De acordo com a literatura, as colónias de *K. pneumoniae* associada a abscesso hepático na comunidade têm um teste de filamento positivo, sendo a hiper-mucoviscosidade definida pela formação de um filamento superior a 5 cm (7). Neste sentido, procedeu-se ao reisolamento em meio sólido da estirpe em estudo para diferenciação fenotípica de supostas sub-populações identificadas por WGS, tendo-se confirmado a presença de três tipos de colónias com diferentes resultados do teste de formação de filamento: 0,5cm, 3cm e 10cm. Estão em curso atualmente novas análises de WGS dirigidas a cada um dos tipos de colónias, com vista ao estabelecimento de uma associação entre características genómicas e os fenótipos observados. Será também efetuado um estudo mais detalhado sobre a presença de genes/mutações associados à resistência a antibióticos, com posterior confirmação fenotípica.

Conclusão

Esta forma distinta de doença invasiva por *K. pneumoniae* responsável por abscesso hepático na comunidade, descrita inicialmente na Ásia, tem emergido com uma distribuição global. A diabetes mellitus e a presença dos dois tipos capsulares específicos da bactéria, predispõem ao desenvolvimento do abscesso hepático e das complicações extrahepáticas: bacterémia, meningite, endoftalmite, e necrosante fascite. De salientar que a doente em estudo não apresentava nenhum fator de risco o que torna o presente caso particularmente invulgar. O diagnóstico atempado e o tratamento antimicrobiano adequado, combinado com drenagem percutânea do

abscesso, aumentam a sobrevivência e previnem o aparecimento das complicações. Desconhece-se se a população asiática é mais propensa a esta infeção, bem como os principais reservatórios para o desenvolvimento de estirpes de *K. pneumoniae* altamente virulentas.

O presente estudo ilustra a potencialidade da WGS para uma rápida identificação e caracterização de estirpes relevantes em termos clínicos, gerando uma multiplicidade de resultados num curto espaço de tempo.

Referências bibliográficas:

- (1) Jong GM, Hsiue TR, Chen CR, et al. Rapidly fatal outcome of bacteremic Klebsiella pneumoniae pneumonia in alcoholics. *Chest*. 1995;107(1):214-7.
- (2) Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(4):589-603. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88898/
- (3) Wang JH, Liu YC, Lee SS, et al. Primary liver abscess due to Klebsiella pneumoniae in Taiwan. *Clin Infect Dis*. 1998;26(6):1434-8. <http://cid.oxfordjournals.org/content/26/6/1434.long>
- (4) Chung DR, Lee SS, Lee HR, et al.; Korean Study Group for Liver Abscess. Emerging invasive liver abscess caused by K1 serotype Klebsiella pneumoniae in Korea. *J Infect*. 2007;54(6):578-83. Epub 2006 Dec 18.
- (5) Struve C, Roe CC, Stegger M, et al. Mapping the Evolution of Hypervirulent Klebsiella pneumoniae. *MBio*. 2015;6(4):e00630. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4513082/
- (6) Yu WL, Ko WC, Cheng KC, et al. Comparison of prevalence of virulence factors for Klebsiella pneumoniae liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62(1):1-6.
- (7) Fang CT, Chuang YP, Shun CT, et al. A novel virulence gene in Klebsiella pneumoniae strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J Exp Med*. 2004;199(5):697-705. <http://jem.rupress.org/content/199/5/697.long>
- (8) Chung DR, Lee HR, Lee SS, et al. Evidence for clonal dissemination of the serotype K1 Klebsiella pneumoniae strain causing invasive liver abscesses in Korea. *J Clin Microbiol*. 2008;46(12):4061-3. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2593285/
- (9) Lin JC, Koh TH, Lee N, et al. Genotypes and virulence in serotype K2 Klebsiella pneumoniae from liver abscess and non-infectious carriers in Hong Kong, Singapore and Taiwan. *Gut Pathog*. 2014;6:21. <http://gutpathogens.biomedcentral.com/articles/10.1186/1757-4749-6-21>
- (10) Pan YJ, Lin TL, Chen YH, et al. Capsular types of Klebsiella pneumoniae revisited by wzc sequencing. *PLoS One*. 2013;8(12):e80670. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3857182/
- (11) Rodríguez-Martínez JM, Díaz de Alba P, Briales A, et al. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum-β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(1):68-73. Epub 2012 Sep 25. <http://jac.oxfordjournals.org/content/68/1/68.long>