



**Universidade de Brasília – UnB**  
**Instituto de Ciências Biológicas - IB**  
**Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana – PPGBM**

**A influência de carboidratos no potencial de virulência de isolados  
de *Klebsiella variicola***

**Aluna: Ana Paula Cardoso**

**Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Amabile de Campos**

**Brasília, DF, Julho de 2025**

Ana Paula Cardoso Almeida

**A influência de carboidratos no potencial de virulência de isolados de  
*Klebsiella variicola***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana para a obtenção do título de Doutor em Biologia Microbiana.

Orientadora: Tatiana Amabile de Campos

Brasília-DF, Julho de 2025

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

### **A influência de carboidratos no potencial de virulência de isolados de *Klebsiella variicola***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana para a obtenção do título de Doutor em Biologia Microbiana.

Ana Paula Cardoso Almeida

Dissertação aprovada em: 01 de Julho de 2025

Comissão examinadora:

1º Membro (Presidente):

Prof. Dra. Tatiana Amabile de Campos (UnB)

2º Membro:

Prof. Dra. Ana Flávia Alves Parente (UnB)

3º Membro:

Prof. Dr. André Pitondo da Silva (UNAERP)

4º Membro:

Prof. Dr. Rafael Nakamura da Silva (UNAERP)

5º Membro (Suplente):

Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins (UnB)

**Dedicatória:**

*"Se queres construir um navio, não convoques homens para cortar madeira ou distribuir tarefas, mas ensina-os a desejar a imensidão do mar."*

(Antoine de Saint-Exupéry)

Aciência não se constrói em saltos, mas em passos pequenos e constantes, como o trabalho das formigas. Nesta jornada, carrego a certeza de que, ainda que eu siga outros rumos, deixei minha contribuição — um pequeno tijolo na grande construção do conhecimento.

## **Agradecimentos**

A Deus, por me abençoar e proteger sempre, especialmente durante este trabalho. Aos meus pais, por sempre me apoiarem e por toda a dedicação ao longo dos anos. Não chegaria aonde estou nem seria quem sou sem vocês. Obrigada pelo cuidado, carinho e pela preocupação de sempre estarem presentes; por todo o amor, paciência e doação. À minha irmã, por todos os momentos e aprendizados compartilhados. Obrigada por serem minha família, minha segurança e minha certeza na vida.

À professora Dra. Tatiana, por ter sido muito mais do que uma orientadora—uma referência de apoio, dedicação e força. Desde meus primeiros passos na ciência, esteve presente, guiando-me com paciência e generosidade. Sua resiliência diante dos desafios e sua capacidade de inspirar, mesmo nos momentos mais difíceis, foram lições que levarei para sempre. Obrigada por compartilhar seu conhecimento com tanta atenção e carinho, influenciando não apenas meu crescimento acadêmico, mas também pessoal.

Ao Dr. André Pitondo, pela parceria e colaboração ao longo de todo este trabalho. À professora Ana Flávia e seus alunos, pelo apoio e colaboração ao longo desta jornada. A parceria de vocês foi essencial em muitos momentos. À banca de qualificação, pelas sugestões e conselhos que contribuíram para o aprimoramento desta pesquisa.

Aos colegas do LAMP, obrigada pela colaboração e assistência em todos os momentos que precisei. O ambiente leve e a prontidão de cada um para ajudar fizeram toda a diferença nesta jornada. Um agradecimento especial à Rafa, pelo suporte em tantas etapas e pelos desafios compartilhados ao longo do caminho.

À minha melhor amiga, Laura, obrigada por sempre estar presente, por me acalmar nos momentos difíceis e por compartilhar seus conhecimentos. Mais do que uma amizade, construímos uma vida de histórias, apoio e carinho, e sou imensamente grata por isso.

Aos colegas de outros laboratórios, obrigada pela paciência e solicitude ao longo desta jornada. Em especial, aos alunos do Prof. Robert—Lucas, Érica e Máquir—pela colaboração, companheirismo e ajuda sempre disposta. Ao Lucas, minha gratidão especial. Sua amizade foi um presente inesperado e valioso neste caminho, trazendo leveza aos dias difíceis e apoio nos momentos mais desafiadores. Obrigada por estar sempre por perto, por dividir conhecimento, conversas e risadas, tornando essa caminhada muito mais especial.

Às organizações de fomento CAPES, FAPDF, FAHUB e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, pelo auxílio financeiro e técnico para a execução deste projeto.

## Resumo

*Klebsiella spp.* é um dos gêneros da família *Enterobacteriaceae* mais associados a infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade. Dentro do gênero, as espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella variicola* são geneticamente próximas e podem causar infecções do trato urinário (ITUs), pulmonares, sanguíneas e septicemias. Além da patogenicidade inerente a ambas as espécies, essas infecções acometem principalmente pacientes imunocomprometidos. No entanto, a identificação equivocada de isolados clínicos de *K. variicola* como *K. pneumoniae* dificulta a intervenção terapêutica, comprometendo o sucesso do tratamento. Dessa forma, a identificação precisa, aliada à caracterização biológica e epidemiológica, é essencial para diferenciar essas espécies e compreender os mecanismos de patogenicidade específicos de *K. variicola*. Assim como *K. pneumoniae*, *K. variicola* apresenta diversos fatores de virulência, incluindo a cápsula polissacarídica (antígeno K), que desempenha um papel crucial na sobrevivência bacteriana no hospedeiro e na formação de biofilme. A cápsula é composta por açúcares sintetizados pela célula bacteriana, e sua relevância como fator de virulência sugere uma possível associação entre a utilização de substratos e a regulação da expressão de genes de virulência e patogenicidade. Este estudo teve como objetivo avaliar a relação entre a utilização de carboidratos como fonte única de carbono e a expressão de fatores de virulência em *K. variicola*. Foram analisadas três linhagens clínicas da espécie, isoladas de urina (Kv15), cateter (Kv57) e sangue (Kv35), provenientes de diferentes pacientes. Inicialmente, avaliou-se o crescimento e a formação de biofilme dos isolados em diferentes fontes de carbono. Após essa análise, quatro carboidratos foram selecionados para caracterizar sua influência em experimentos adicionais, incluindo a produção de biofilme maduro, de sideróforos e a sobrevivência em soro humano. Além disso, a expressão do gene *mrkA*, relacionado à adesão e formação de biofilme, foi quantificada por qRT-PCR. Os resultados demonstraram que a utilização de carboidratos como fontes de carbono influencia diretamente a virulência de *K. variicola*. A utilização de maltose e sorbitol favoreceu a formação de biofilme, enquanto a galactose impactou significativamente a expressão de genes associados à adesão bacteriana. A sobrevivência em soro humano variou entre os isolados e as condições testadas, indicando um papel regulatório dos açúcares na adaptação bacteriana. Esses achados reforçam a importância de compreender a interação entre metabolismo e virulência em *K. variicola*, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e diagnósticas mais eficazes no combate às infecções causadas por essa bactéria emergente.

**Palavras-chave:** *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella variicola*, patogenicidade, virulência, carboidratos.

## Abstract

*Klebsiella spp* is one of the genres of the *Enterobacteriaceae* family frequently associated with nosocomial and community-acquired infections. Within the genus, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola* species are genetically close and can cause urinary tract infections (UTIs), pulmonary infections, bloodstream infections and septicemia. In addition to the pathogenicity, these infections mainly affect immunocompromised patients. However, the mistaken identification of *K. variicola* as *K. pneumoniae* becomes the therapeutic intervention difficult, compromising the outcome of treatment. Thus, the precise identification, combined with biological and epidemiological characterization, is essential to differentiate these species and to understand the pathogenicity mechanisms specific to *K. variicola*. Like *K. pneumoniae*, *K. variicola* has several virulence factors, including polysaccharide capsule (antigen K), which plays a crucial role in bacterial survival in the host and biofilm formation. The capsule is made up of sugars synthesized by the bacterial cell, and its relevance as a factor of virulence suggests a possible association between the use of substrates and the regulation of the expression of virulence and pathogenicity genes. This study aimed to evaluate the relationship between the use of carbohydrates, as sole source of carbon, and the expression of *K. variicola* virulence factors. Three clinical strains were analyzed: one isolated from urine (Kv 15), one from catheter (Kv 57), and one from blood infection (Kv 35). Initially, the bacterial growth and biofilm formation was evaluated in broth containing different carbohydrates as sole sources of carbon. Four carbohydrates were selected to characterize their influence on additional experiments, including mature biofilm production, siderophores, and bacterial survival in human serum. In addition, the expression of the *mrkA* gene, related to adhesion and biofilm formation, was quantified by qRT-PCR. The results showed that the use of carbohydrates directly influences the virulence of *K. variicola*. The use of maltose and sorbitol favored biofilm formation, while galactose significantly impacted the expression of genes associated with bacterial adhesion. Survival in human serum varied between isolates and tested conditions, indicating a regulatory role of sugars in bacterial adaptation. These findings reinforce the importance of understanding the interaction between metabolism and virulence in *K. variicola*, contributing to the development of more effective therapeutic and diagnostic strategies in combating infections caused by this bacterium.

**Keywords:** *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella variicola*, pathogenicity, virulence factors, carbohydrates.

## Lista de Figuras

- Figura 1. Métodos disponíveis para diferenciar as espécies do complexo *Klebsiella pneumoniae*. A cor preta indica que o método distingue as espécies do complexo, enquanto a cor cinza indica o contrário. Métodos microbiológicos referem-se a testes bioquímicos padrão. PCR inclui genes *B*-lactamases e genes específicos, como o *yggE*. Análises genômicas, como ANI e SNPs, e proteômicas, como MALDI-TOF com bibliotecas atualizadas, são eficazes para identificação precisa. Asteriscos indicam a inclusão de subespécies. Figura adaptada de Rodriguez-Medina et al.2019. .... 19
- Figura 2. Diversidade ecológica e geográfica de *Klebsiella variicola*. A distribuição é apresentada com base na identificação inicial das espécies, localização geográfica, fonte de isolamento. Os dados destacam a capacidade de adaptação de *K. variicola*, isolada de plantas, água, efluentes industriais e amostras clínicas humanas, como sangue e urina .ambientes diversos como plantas, água e efluentes industriais, além de amostras clínicas humanas, como sangue e urina. Figura adaptada de Potter et al 2018. .... 22
- Figura3 .Mapa geográfico indicando a localização de isolados multirresistentes (MDR) e hipervirulentos de *Klebsiella variicola* (hvKv) de diferentes fontes de isolamento. O círculo vermelho indica isolados clínicos, o círculo verde refere-se a isolados de plantas de *K. variicola* e o círculo azul representa os isolados ambientais. Os números entre parênteses indicam o número de isolados relatados tanto para MDR quanto para hvKv. Figura adaptada de Rodriguez-Medina et al2019. .... 26
- Figura 4. Rede metabólica da utilização de diferentes fontes de carbono em bactérias. Substratos do Grupo A (destacados em verde) podem ser utilizados simultaneamente com os do Grupo B (destacados em vermelho), enquanto pares do Grupo A geralmente apresentam diauxia. Os principais caminhos metabólicos estão representados, evidenciando a interconexão entre glicólise, o ácido tricarbóxico (TCA) e a biossíntese de componentes celulares. Os precursores de biomoléculas essenciais, como aminoácidos (moldura marrom) e outros componentes estruturais (moldura laranja) são agrupados em pools metabólicos (a-d, indicados por molduras tracejadas). Todas as fontes de carbono do grupo A entram na via metabólica a partir da conversão de glicose-6-fosfato (G6P) para frutose-6-fosfato (F6P), enquanto os do grupo B são incorporados em diferentes pontos após a glicólise. Adaptado de Wang X et al 2019. .... 34
- Figura 5. Modelo proposto de resistência induzida por glicose às polimixinas em HiAlc *Klebsiella pneumoniae*. As polimixinas podem se ligar eletrostaticamente ao lipídio A ou inibir a NADH-quinona oxidoreductase tipo II (NDH-2), levando ao vazamento do conteúdo citoplasmático e à depleção de ATP, o que contribui para a morte celular (D). A glicose induz resistência bacteriana às polimixinas por dois mecanismos: (i) inibição da expressão do gene *crp*, proovendo a produção de polissacarídeos capsulares (CPS) e aumentando a resistência antimicrobiana, e (ii) manutenção de níveis elevados de ATP por meio da ativação da glicólise, do ciclo ácido tricarbóxico (TCA) e da cadeia de transporte de elétrons (ETC), aumentando a sobrevivência celular. Adaptado de Fan et al 2023. .... 37
- Figura 6.. Esquema experimental representando as etapas de triagem e análise de virulência em isolados de *Klebsiella variicola*. Na etapa 1, diferentes fontes de carbono foram submetidas a testes de crescimento bacteriano (curvas de crescimento) e formação de biofilme (24h), compondo a triagem inicial. As condições que apresentaram maior taxa de crescimento e maior capacidade de formação de biofilme foram selecionadas para a etapa 2.

Nesta fase, foram conduzidos experimentos funcionais de avaliação da virulência e resposta metabólica, incluindo produção de biofilme por 5 dias, quantificação de sideróforos, ensaio de sobrevivência em soro humano e expressão do gene de virulência *mrkA*. ..... 41

Figura 7. Crescimento de *Klebsiella variicola* em diferentes fontes de carbono. Os gráficos mostram a curva de crescimento (A,D,G), a taxa de crescimento (B,E,H) e o tempo de geração (C,F,I) para os isolados Kv 15, Kv 35 e Kv 57, respectivamente. Foram testadas várias fontes de carbono (glicose, frutose, galactose, lactose, maltose, manose, sacarose, sorbitol), juntamente com o meio controle (M9 e LB). Os dados destacam a influência das fontes de carbono no metabolismo bacteriano, mostrando variabilidade na adaptação metabólica entre os isolados. A análise estatística foi realizada usando ANOVA oneway. Asteriscos indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ) em comparação com a glicose como controle. .... 51

Figura 8. Formação de biofilme por *Klebsiella variicola* durante 5 dias em diferentes fontes de carbono. Os gráficos representam a densidade óptica (OD) a 570nm de biofilmes formados pelos isolados Kv 15, Kv 35, Kv 57 de *K. variicola* cultivados em meio mínimo (M9) suplementado com glicose (A), sorbitol (B), galactose (C) e maltose (D) como única fonte de carbono. A linhagem hiper mucoviscosa (HMV) foi utilizada como controle. As barras indicam a média e o desvio padrão das leituras de OD após a coloração com cristal violeta. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA, com  $p < 0,005$  ..... 58

Figura 9. Quantificação de produção de sideróforos pelas linhagens de *Klebsiella variicola* HMV (A), Kv 15 (B), Kv 35 (C) e Kv 57 (D) na glicose, sorbitol, maltose e galactose. A quantificação ocorre usando a fórmula  $((\text{ref} - \text{amostra}) / \text{ref}) * 100$ , com a ref sendo a absorção da referência e da amostra sendo a absorção da amostra testada. Em (e) temos a produção de sideróforos na glicose mostrando diferenças significativas na produção (\*\*). Em (f) a produção de sideróforos em sorbitol também com significância. Na (g) produção de galactose, que não se apresentou significativa entre a amostra. Em (h) a produção de sideróforo em maltose, apresentando diferenças significativas entre as amostras ..... 60

Figura 10. Sobrevivência dos isolados de *Klebsiella variicola* na incubação no soro humano por 120 minutos. Os isolados foram cultivados anteriormente em M9 suplementado com glicose, sorbitol, galactose ou manose. O resultado da CFU realizado com a incubação de HMV no soro é exibido em (a). A representação do resultado da sobrevivência do HMV na porcentagem é mostrada em (b). Para KV 15, em (c) a UFC de sobrevivência de sua linhagem no soro e em (d) o resultado em porcentagem de sobrevivência. A sobrevivência sérica do KV 35 é representada em (e) e em porcentagem em (f). Finalmente, a sobrevivência sérica para o KV 57 está representada em (g) e sua sobrevivência em porcentagem em (h) ..... 66

Figura 11. Expressão relativa do gene *mrkA* em isolados de *Klebsiella variicola* cultivados em diferentes fontes de carbono. A expressão foi quantificada por **PCR em tempo real (RT-qPCR)**, normalizada pelo gene de referência e comparada ao controle cultivado em glicose. Os gráficos mostram a variação da expressão em meio contendo **sorbitol, galactose e maltose** para os isolados **Kv 15 (A), Kv 35 (B) e Kv 57 (C)**. As barras representam a média e o desvio padrão da expressão relativa. A análise estatística foi realizada utilizando **ANOVA**, e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). ..... 69

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Características fenotípicas e genotípicas das cepas de <i>Klebsiella variicola</i> analisadas neste estudo. ....	42
Tabela 2. Fontes de carbono utilizadas nos experimentos. ....	44
Tabela 3. Modelo utilizado para a classificação de produção de biofilme de acordo com a média aritmética obtida da triplicata da absorbância atingida na leitura do teste. VA: valor de absorbância obtido da amostra, DO: densidade ótica (STEPANOVIĆ et al.2004). ....	46
Tabela 4. Sequências dos primers utilizados para os genes <i>rrsH</i> e <i>mrkA</i> . ....	49
Tabela 5. Média e desvio padrão de DO (570 nm) na formação de biofilme de 24 horas de cepas bacterianas em meio M9 contendo 2% das diferentes fontes de carbono e em meio Luria Bertani (LB) .....	55

## **Abreviaturas:**

BLSEs: beta-lactamases de espectro estendido

BSI: infecções sanguíneas

CFU: Unidade Formadora de Colônia

cKpn: *K. pneumoniae* clássica

CAS: Chrome Azurol S

CPS: Produção de polissacarídeos capsulares

CRC: Repressão catabólica por carbono

ERIC :Sequências Consensus Repetitivas de Enterobactérias

HUB: Hospital Universitário de Brasília

HvKv: *K. variicola* hipervirulentas

ITUs: infecções do trato urinário

LPS: Lipopolissacarídeo

MDR: multirresistentes

HmvKV: *Klebsiella variicola* hipermucoviscosa/hipermucoíde

PCR: reação polimerase em cadeia

PTS: Fosforilação

qRT-PCR: reação polimerase em cadeia em tempo real

TCA: Ciclo do ácido tricarbóxico

WGS: Sequenciamento completo do genoma

## Sumário

<b>Introdução.....</b>	<b>17</b>
<b><i>Klebsiella variicola</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>Emergência de <i>Klebsiella variicola</i> como patógeno humano .....</b>	<b>20</b>
<b>Emergência de linhagens multirresistentes .....</b>	<b>23</b>
<b>Características de virulência e patogenicidade .....</b>	<b>26</b>
<b>Diferenças funcionais e genéticas entre <i>K. pneumoniae</i> e <i>K.variicola</i> .....</b>	<b>28</b>
<b>Classificação de linhagens: Clássicas, Hiper mucoviscosas e Hipervirulentas .....</b>	<b>29</b>
1. Linhagem Clássica(cKv):.....	30
2. Linhagem Hiper mucoviscosa(hmvKv): .....	30
3. Linhagem Hipervirulenta(hvKv): .....	31
<b>Perspectivas futuras .....</b>	<b>32</b>
<b>Metabolismo de carboidratos e fontes de carbono .....</b>	<b>32</b>
<b>Justificativa.....</b>	<b>39</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>40</b>
Objetivo Geral.....	40
Objetivos Específicos .....	40
<b>Desenho Experimental: .....</b>	<b>41</b>
<b><i>Material e Métodos</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>1. Isolamento, cultivo e armazenamento das linhagens bacterianas .....</b>	<b>42</b>
<b>2 . Meios de cultura e condições de cultivo .....</b>	<b>42</b>
2.1 LuriaBertani(SEZONOV;JOSELEAU-PETIT; D'ARL,2007).....	43
2.2 Meio Mínimo (SAMBROOK, J.; RUSSELL, 2001) .....	43
<b>3.Curva de crescimento .....</b>	<b>44</b>
<b>4. Quantificação da produção de biofilme em superfícies de poliestireno .....</b>	<b>45</b>
<b>5. Quantificação da produção de sideróforo .....</b>	<b>46</b>
<b>6. Sobrevivência em soro humano .....</b>	<b>48</b>
<b>6.PCR quantitativa para RNA (qt-RT-PCR) .....</b>	<b>49</b>
6.1Desenho dos primers .....	49
6.2 Extração de RNA e síntese de cDNA .....	49
<b>8. Análises estatísticas .....</b>	<b>50</b>
<b><i>Resultados e Discussão:</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>Curva de crescimento bacteriano .....</b>	<b>51</b>
<b>2. Produção de biofilme em superfície de poliestireno em 24 horas .....</b>	<b>54</b>
<b>3. Produção de biofilme em superfície de poliestireno em 5 dias .....</b>	<b>57</b>
<b>5.Quantificação da produção de sideróforos .....</b>	<b>59</b>
<b>6.Sobrevivência bacteriana em soro humano .....</b>	<b>65</b>
<b>7. Quantificação da expressão do gene <i>mrkA</i> por PCR quantitativa .....</b>	<b>69</b>
<b><i>Conclusões:</i> .....</b>	<b>72</b>
<b><i>Anexos:</i> .....</b>	<b>75</b>

*Referências:* ..... 76

## **Introdução**

*Klebsiella spp.* são bacilos Gram-negativos da família *Enterobacteraceae*, frequentemente associados a infecções oportunistas e à disseminação de resistência a antibióticos (IREDELL; BROWN; TAGG, 2016). Este gênero é um dos mais relacionados a infecções hospitalares, sendo formado por patógenos oportunistas que infectam principalmente pacientes imunocomprometidos, como portadores de diabetes. Esses microrganismos também podem causar infecções graves, incluindo septicemia, pneumonia e infecções do trato urinário (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017).

*Klebsiella* é um gênero composto por diversas espécies, das quais *K. pneumoniae* é a mais frequentemente associada às infecções hospitalares. Contudo, nos últimos anos, outra espécie do gênero, a *K. variicola*, tem sido erroneamente identificada como *K. pneumoniae*, devido a semelhanças fenotípicas e bioquímicas entre as espécies, o que dificulta o estudo específico dessa espécie (KILEY et al., 2021; SEKI et al., 2013).

### ***Klebsiella variicola***

*Klebsiella variicola* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo e imóvel, pertencente à família *Enterobacteriaceae* (RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019). Embora frequentemente associada a infecções oportunistas em humanos, essa bactéria também pode ser encontrada em plantas e animais, demonstrando sua ampla distribuição ambiental (GARZA-RAMOS et al., 2015; MONDO et al., 2021). Apesar de seu perfil oportunista, algumas linhagens apresentam características de hipervirulência e multirresistência a antimicrobianos, especialmente em países como México, China, Bangladesh, Estados Unidos, Colômbia e Brasil.

(CAMPOS et al., 2021; FARZANA et al., 2019; KILEY et al., 2021; LU et al., 2018; MORALES-LEÓN et al., 2021).

Devido às semelhanças bioquímicas e fenotípicas com outras espécies do complexo *Klebsiella*, como *K. pneumoniae*, *K. variicola* é frequentemente identificada erroneamente por testes bioquímicos convencionais e sistemas microbiológicos automatizados amplamente utilizados (CAMPOS et al., 2021; RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019). Essa identificação incorreta limita o estudo da espécie, resultando em lacunas no conhecimento sobre suas particularidades clínicas e epidemiológicas (CAMPOS et al., 2021; RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019).

O diagnóstico correto e precoce de *K. variicola* é essencial, especialmente por estar associada a infecções humanas graves (BARRIOS-CAMACHO et al., 2019; FARZANA et al., 2019; QUISPE, 2023). Felizmente, avanços em métodos moleculares, genômicos e proteômicos possibilitam a identificação precisa da espécie (Figura 1). Entre esses, destacam-se as PCRs multiplex direcionadas a caracterização dos genes *housekeeping* (como *rpoB*, *gyrA*, *nifH*, *infB*, *phoE* e *mdH*) (CAMPOS et al., 2021; GARZA-RAMOS et al., 2015b; RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019) e PCRs baseadas em genes únicos específicos, como *yggE* (BERRY; LOEFFELHOLZ; WILLIAMS-BOUYER, 2015).

Além disso, métodos genômicos, como o sequenciamento completo do genoma WGS (*Whole genome sequence*), são ferramentas eficazes, embora ainda de custo elevado para a rotina laboratorial. Alternativas como a ferramenta KlebSeq têm sido propostas para a detecção e caracterização de patógenos com base no sequenciamento de genes-alvo. Essa abordagem é promissora para triagem e vigilância epidemiológica do gênero *Klebsiella*, incluindo membros do complexo *K. pneumoniae* (*K. pneumoniae*, *K. variicola* e *K. quasipneumoniae*), sem a necessidade de cultivo (BOWERS et al., 2016).

A espectrometria de massa MALDI-TOF com bibliotecas atualizadas (como a versão 6.0.0.0) e o MALDI-TOF Biotyper também demonstraram alta eficiência na identificação e diferenciação de *K. variicola* (OHAMA et al., 2022). Entretanto, tanto o MALDI-TOF quanto o WGS, apesar de eficazes, apresentam limitações em termos de custo e prática para laboratórios clínicos de rotina. Nesse contexto, a PCR multiplex surge como uma alternativa mais acessível e prática (OHAMA et al., 2022; RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019). Portanto, a combinação de métodos moleculares, genômicos e proteômicos, adaptados às necessidades dos laboratórios clínicos, é essencial para melhorar o manejo clínico e fortalecer as estratégias de vigilância epidemiológica. A figura 1 ilustra os métodos disponíveis para a identificação de espécies do complexo *Klebsiella pneumoniae*.

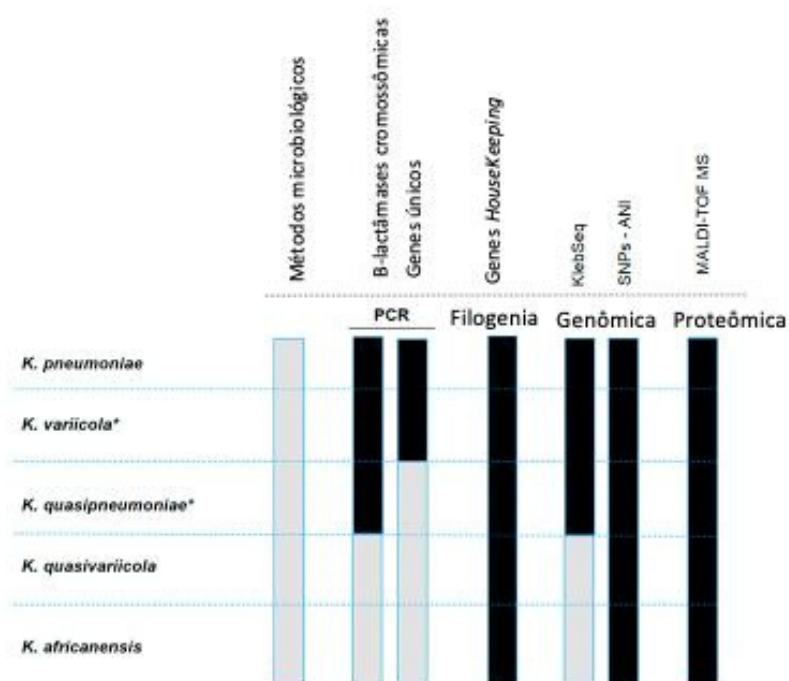


Figura 1. Métodos disponíveis para diferenciar as espécies do complexo *Klebsiella pneumoniae*. A cor preta indica que o método distingue as espécies do complexo, enquanto a cor cinza indica o contrário. Métodos microbiológicos referem-se a testes bioquímicos padrão. PCR inclui genes *B*-lactamases e genes específicos, como o *yggE*. Análises genômicas, como ANI e SNPs, e proteômicas, como MALDI-TOF com bibliotecas atualizadas, são eficazes para identificação precisa. Asteriscos indicam a inclusão de subespécies. Figura adaptada de Rodriguez-Medina et al.2019.

## **Emergência de *Klebsiella variicola* como patógeno humano**

Assim como *K. pneumoniae*, *K. variicola* é um patógeno oportunista responsável por infecções hospitalares, infecções do trato respiratório e infecções do trato urinário (ITUs). Devido à elevada similaridade genética entre as duas espécies, testes bioquímicos utilizados para diagnósticos identificaram frequentemente *K. variicola* como *K. pneumoniae* (CAMPOS et al., 2021; LU et al., 2018; MORALES-LEÓN et al., 2021; RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019).

Entre os membros do complexo *K. pneumoniae*, a espécie *K. pneumoniae* é o patógeno mais frequentemente associado a infecções sanguíneas (BSIs). No entanto, pacientes diagnosticados com BSIs causadas por *K. variicola* apresentam altas taxas de mortalidade (MAATALLAH et al., 2014; RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019). As BSIs representam um enorme desafio para os sistemas de saúde, e a detecção precoce do patógeno é crucial para uma terapia antimicrobiana eficaz (ANGUS;WAX,2001). Em estudos relatados, infecções por *K. variicola* demonstraram maior mortalidade, além da presença de linhagens multirresistentes (MDR), embora não tenham sido observados fatores de virulência adicionais conhecidos que expliquem essa maior letalidade (CAMPOS et al., 2021; MAATALLAH et al., 2014; MORALES-LEÓN et al., 2021; ROSENBLUETH et al., 2004).

Adicionalmente, *K. variicola* tem sido associada a infecções em indivíduos imunocomprometidos, incluindo aqueles com condições como lúpus, diabetes mellitus, câncer, doenças hepatobiliares e outros transtornos (CHEN et al., 2020; MEATHERALL et al., 2009; RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019). Berry et al. (2015) descreveram um caso de BSI causada por *K. variicola* em uma paciente com lúpus eritematoso sistêmico. No Japão, um caso de sepse fatal também foi atribuído a *K. variicola*, erroneamente identificada como *K. pneumoniae*. O paciente veio a óbito apesar da administração imediata de antibióticos aos quais a *K. variicola*

era suscetível (SEKI et al., 2013). Outro estudo relatado por Ledebøer et al., 2015 descreveu que 25 de 26 hemoculturas inicialmente identificadas como *K. pneumoniae* foram posteriormente identificadas como *K. variicola*. Esses isolados foram coletados em diferentes centros clínicos para validar uma ferramenta diagnóstica específica para bactérias Gram-negativas causadoras de BSIs (BERRY; LOEFFELHOLZ; WILLIAMS-BOUYER, 2015; RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019). Além disso, também há registros de coinfeções por *K. pneumoniae* e *K. variicola* (GARZA-RAMOS et al., 2016; HUANG et al., 2021).

As ITUs, por sua vez, representam um problema significativo de saúde pública e são acompanhadas por um considerável impacto econômico. Esses quadros são causados principalmente por bactérias Gram-negativas, sendo a *Escherichia coli* o agente etiológico mais prevalente, seguida por *K. pneumoniae*, que ocupa a segunda posição em frequência. Contudo, devido ao problema de identificação incorreta, *K. variicola* é um patógeno subnotificado, mas igualmente capaz de causar ITUs, conforme demonstrado por Potter et al. (2018). Nesse estudo, conduzido em uma coleção de isolados clínicos de *K. variicola*, foi demonstrado que 70% (39/56) dos isolados foram recuperados de ITUs. Utilizando um modelo murino, os autores confirmaram o potencial uropatogênico de algumas estirpes de *K. variicola* (POTTER et al., 2018; RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019). Ademais, a uropatogenicidade dessa espécie foi associada à expressão de novas proteínas fimbriais tipo 1.

Além disso, estudos prévios apontam a ampla diversidade ecológica e geográfica de *K. variicola*, com isolados provenientes de diferentes continentes e uma variedade de ambientes, como sangue, urina, plantas e água (Figura 2). Essa característica reforça sua capacidade de adaptação e sua relevância tanto no contexto clínico quanto ambiental. Essa diversidade está ilustrada na Figura 2, que apresenta a distribuição de *K. variicola* em diferentes fontes de

isolamento e localizações, evidenciando a complexidade de sua epidemiologia (POTTER et al., 2018).

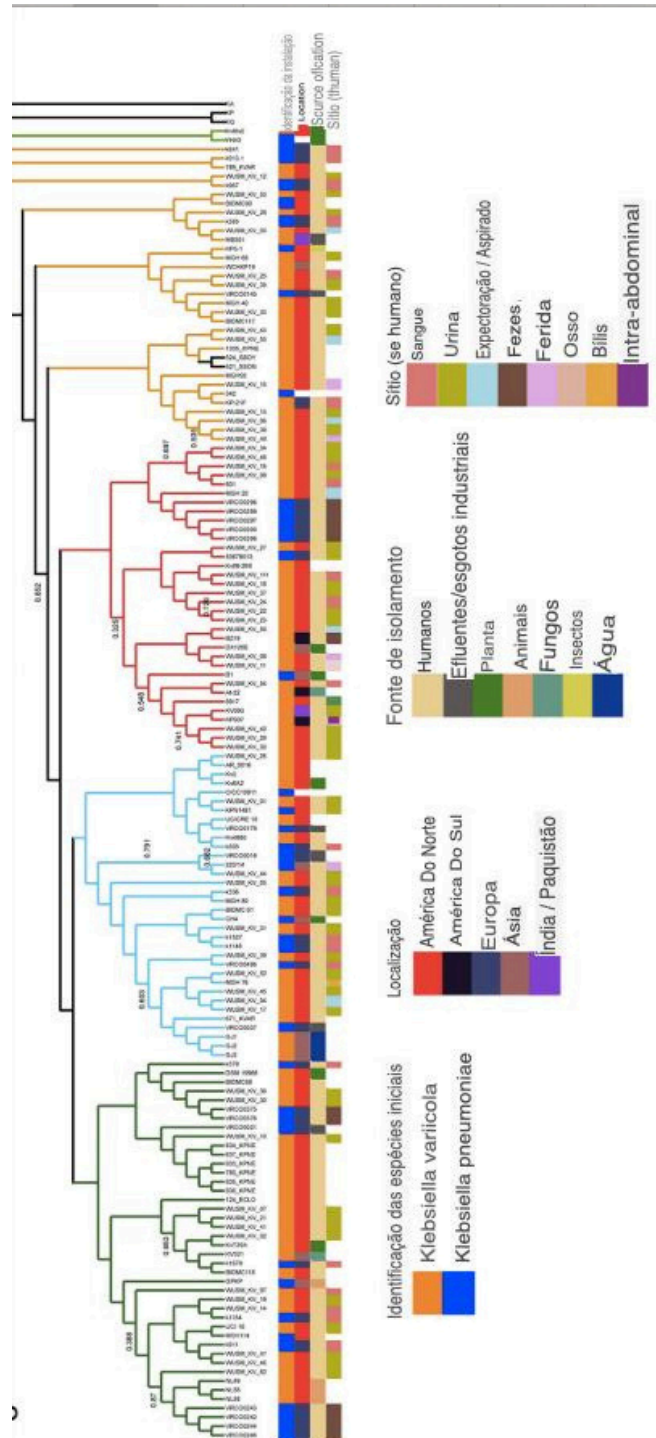


Figura 2. Diversidade ecológica e geográfica de *Klebsiella variicola*. A distribuição é apresentada com base na identificação inicial das espécies, localização geográfica, fonte de isolamento. Os dados destacam a capacidade de adaptação de *K. variicola*, isolada de plantas, água, efluentes industriais e amostras clínicas humanas, como sangue e urina. ambientes diversos como plantas, água e efluentes industriais, além de amostras clínicas humanas, como sangue e urina. Figura adaptada de Potter et al 2018.

No presente estudo, os isolados clínicos de *K. variicola* analisados foram obtidos de diferentes origens, incluindo urina, sangue e cateteres, representando quadros clínicos de ITUs e BSIs. Esses isolados, provenientes de pacientes de ambos os gêneros, com idades variando entre 54 e 75 anos, reforçam a associação de *K. variicola* com infecções graves em ambientes hospitalares.

Esses achados destacam a urgência de métodos diagnósticos mais precisos para *K. variicola*, dada sua capacidade de causar infecções graves e potencialmente fatais, que frequentemente passam despercebidas ou são atribuídas a outras espécies do complexo *K. pneumoniae*. A emergência de *K. variicola* como um patógeno humano sublinha a importância de estudos adicionais para compreender seus mecanismos de virulência, resistência antimicrobiana e impacto clínico.

### **Emergência de linhagens multirresistentes**

Ao se comparar padrões de resistência relacionados à *K. variicola*, observa-se uma mudança significativa devido ao aumento no número de relatos de isolados multirresistentes (MDR) (CAMPOS et al., 2021; GARZA-RAMOS et al., 2016; LONG et al., 2017; WANG et al., 2022). Da mesma forma, relatos de isolados produtores de BLSEs (beta-lactamases de espectro estendido) e carbapenemase têm crescido, mesmo em ambientes não clínicos, destacando o papel do ambiente como reservatório de genes de resistência antimicrobiana (Figura 3) (DI et al., 2017; RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019; ZURFLUH et al., 2015). Long et al. (2017) demonstraram que *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* e *K. variicola* compartilham genes cromossômicos e móveis que codificam fatores de virulência e resistência antimicrobiana.

Entre os genes de resistência detectados em *K. variicola*, destacam-se as  $\beta$ -lactamases *bla*LEN, *bla*CTX-M e *bla*NDM. O gene *bla*LEN, intrínseco à *K. variicola*, está presente em quase todos os isolados e confere resistência a penicilinas como ampicilina, sendo considerado uma característica marcante da espécie. *bla*CTX-M, é responsável por resistência a cefalosporinas de terceira geração, enquanto *bla*NDM codifica uma carbapenemase amplamente associada a falhas terapêuticas no tratamento de infecções graves, como em infecções hospitalares (CAMPOS et al., 2021; POTTER et al., 2018). Esses genes são frequentemente transportados por plasmídeos de *replicon* do tipo IncF, conhecidos por sua alta eficiência na disseminação de genes de resistência entre microrganismos.

Os isolados clínicos utilizados neste trabalho, Kv15, Kv35 e Kv57, reforçam esse perfil multirresistente amplamente documentado. Essas estirpes exibem resistência a antimicrobianos como aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, sulfonamidas e nitrofurantoína, características frequentemente observadas em isolados clínicos e ambientais descritos na literatura (CAMPOS et al., 2021; RAMIREZ et al., 2014). Essas informações reforçam a relevância do uso dessas cepas como modelo para investigar a disseminação da resistência antimicrobiana.

A Figura 3 apresenta um mapa global de distribuição de isolados multirresistentes (MDR) e hipervirulentos (*hvKv*) de *K. variicola*. Embora os dados sejam baseados em estudos prévios e possam não refletir os padrões mais recentes, a figura ainda serve como uma referência importante para compreender a dispersão global desses isolados em diferentes contextos, como isolados clínicos, ambientais e vegetais (RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019). Esse padrão global evidencia a complexidade da interconexão entre reservatórios ambientais e hospitalares.

A disseminação de carbapenemases é frequentemente acompanhada por genes adicionais de resistência transportados por elementos genéticos móveis, o que aumenta a

possibilidade de propagação entre microrganismos no ambiente. Além disso, genes de resistência a aminoglicosídeos, quinolonas e outros antibióticos têm sido detectados em *K. variicola*, reforçando seu perfil multirresistente. Estudos mostram que isolados ambientais, como os encontrados em vegetais frescos e rios urbanos, frequentemente compartilham esses genes com isolados clínicos, demonstrando a importância de monitorar reservatórios ambientais e humanos como parte das estratégias de controle e prevenção (GEKENIDIS et al., 2020; POTTER et al., 2018; ZURFLUH et al., 2015).

Plasmídeos desempenham um papel central na disseminação de genes de resistência e virulência em *K. variicola*. Esses plasmídeos são amplamente compartilhados com outras espécies do complexo *K. pneumoniae*, e a transferência horizontal de genes emerge como o principal mecanismo que impulsiona a adaptação dessa espécie. A vigilância contínua e estratégias integradas são, portanto, essenciais para mitigar os riscos associados à disseminação de linhagens multirresistentes (RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019).

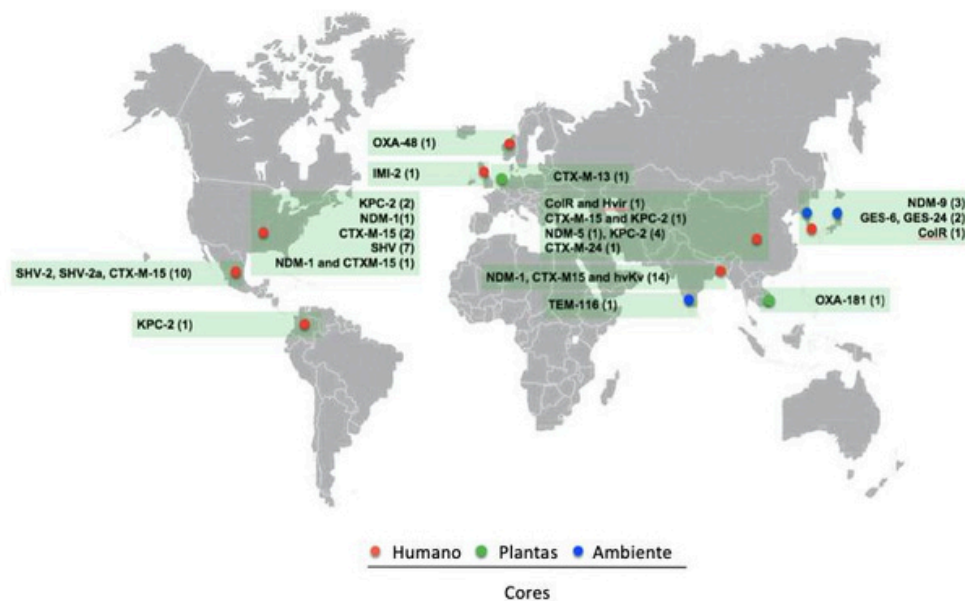


Figura 3 .Mapa geográfico indicando a localização de isolados multirresistentes (MDR) e hipervirulentos de *Klebsiella variicola* (hvKv) de diferentes fontes de isolamento. O círculo vermelho indica isolados clínicos, o círculo verde refere-se a isolados de plantas de *K. variicola* e o círculo azul representa os isolados ambientais. Os números entre parênteses indicam o número de isolados relatados tanto para MDR quanto para hvKv. Figura adaptada de Rodriguez-Medina et al 2019.

### Características de virulência e patogenicidade

A maioria dos fatores de virulência observados em *Klebsiella variicola* corresponde àqueles previamente descritos em *K. pneumoniae*. Entre os principais fatores estão a cápsula, o lipopolissacarídeo (LPS), os sideróforos e as fímbrias, que desempenham papéis cruciais na evasão do sistema imunológico e na colonização de diferentes hospedeiros. Evidências sugerem que *K. variicola* pode apresentar um potencial de virulência semelhante ao de *K. pneumoniae* (LONG et al., 2017; MAATALLAH et al., 2014; RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019).

Os genes de virulência amplamente conservados em *K. variicola* incluem aqueles responsáveis pela biossíntese das fímbrias tipo 1 e tipo 3 (*fim* e *mrk*), metabolismo da ureia

(*ureA*), biossíntese do núcleo do LPS (*wabG*) e captação de ferro, como os sistemas de enterobactina (*entB*) e KfuABC. Além disso, o receptor do sideróforo aerobactina (*iutA*) foi identificado em todos os genomas analisados, embora os genes necessários para a biossíntese do sideróforo (*iucABCD*) não tenham sido detectados (RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019).

Linhagens hipervirulentas de *K. variicola* frequentemente abrigam genes de virulência em grandes plasmídeos, incluindo sideróforos como aerobactina, salmochelina e yersiniabactina. Esses plasmídeos também contêm os reguladores do fenótipo mucóide *rmpA* e *rmpA2*, que estão associados a uma maior virulência e persistência em modelos experimentais (LU et al., 2018).

Ainda não está claro se mecanismos específicos de virulência estão diretamente associados a quadros clínicos graves, como infecções sanguíneas (BSIs), que são frequentemente atribuídas a *K. variicola*. Estudos sugerem que novos genes de virulência ainda não caracterizados possam desempenhar um papel importante na patogênese dessas infecções graves (FARZANA et al., 2019; MAATALLAH et al., 2014). Assim como outras espécies do complexo *K. pneumoniae*, o genoma de *K. variicola* é considerado aberto, conferindo-lhe uma capacidade única de adquirir novos genes que promovem sua adaptação a diferentes ambientes. Essa plasticidade genômica inclui a incorporação de genes de resistência antimicrobiana e novos fatores de virulência, ampliando seu potencial patogênico e reforçando sua emergência como patógeno relevante em humanos e outros hospedeiros (HOLT et al., 2015; RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019).

## Diferenças funcionais e genéticas entre *K. pneumoniae* e *K. variicola*

Embora compartilhe diversos fatores de virulência com *K. pneumoniae*, *K. variicola* apresenta características genômicas e funcionais que a diferenciam. Por exemplo, genes como *wecA*, *msrA* e *orfKPK-3791* foram identificados em *K. variicola*, mas estão ausentes em algumas linhagens de *K. pneumoniae*. Esses genes, embora ainda não completamente caracterizados, podem desempenhar papéis exclusivos na patogênese de *K. variicola* (RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019).

Além disso, estudos apontam diferenças na expressão e função de fímbrias tipo 1. Novas proteínas associadas ao sistema de fímbrias, como *fimV*, foram identificadas exclusivamente em *K. variicola*, indicando adaptações que favorecem sua colonização em ambientes específicos, como o trato urinário, onde a espécie demonstra um elevado potencial uropatogênico. *K. variicola* também foi capaz de crescer mais rapidamente que *K. pneumoniae* em órgãos de modelos murinos, como bexiga e rins, destacando o papel das fímbrias nessas infecções (POTTER et al., 2018).

Estudos genômicos também sugerem que *K. variicola* possui configurações específicas de genes de sideróforos, como aerobactina e yersiniabactina, frequentemente localizados em plasmídeos de grande porte. Esses genes, quando presentes, são associados a linhagens hipervirulentas e podem contribuir para a sua disseminação em ambientes clínicos e ambientais. Em contrapartida, *K. pneumoniae* apresenta esses genes com menor frequência em plasmídeos hipervirulentos, indicando diferenças significativas na plasticidade genômica entre as espécies (CAMPOS et al., 2021; LU et al., 2018; RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019).

Além disso, Maatallah et al., 2014 observaram que isolados de *K. variicola* provenientes de infecções sanguíneas apresentam maior mortalidade em comparação a linhagens de *K.*

*pneumoniae*, sugerindo que mecanismos ainda não elucidados podem contribuir para quadros mais graves de patogenicidade em *K. variicola*.

### **Classificação de linhagens: Clássicas, Hipermucoviscosas e Hipervirulentas**

Atualmente, *Klebsiella pneumoniae* é amplamente reconhecida por apresentar dois fenótipos distintos: cepas clássicas (*cKp*) e hipervirulentas (*hvKp*) (RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019). Enquanto as cepas clássicas ocorrem predominantemente em ambientes hospitalares e instituições de cuidados prolongados, sendo frequentemente resistentes a múltiplas classes de antibióticos, as cepas hipervirulentas diferem pela capacidade de causar infecções graves em populações tanto saudáveis quanto imunocomprometidas na comunidade (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017; SHON; BAJWA; RUSSO, 2013). Esses fenótipos são definidos por características genômicas e fenotípicas distintas, como a produção de sideróforos, cápsulas hipermucoviscosas e marcadores genéticos como os genes *rmpA/rmpA2* e *peg-344* (SHON; BAJWA; RUSSO, 2013; WU et al., 2017). Estudos genômicos confirmam que *cKpn* e *hvKpn* representam linhagens bem separadas, com características específicas que influenciam a evolução e disseminação desses fenótipos (BIALEK-DAVENET et al., 2014; STRUVE et al., 2015).

De forma semelhante, *Klebsiella variicola* apresenta três fenótipos descritos: clássicas (*cKv*), hipermucoviscosas (*hmvKv*) e hipervirulentas (*hvKv*) (RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019). Essa classificação baseia-se em relatos da literatura, uma vez que as correlações entre os traços genômicos e fenotípicos de *K. variicola* ainda não foram completamente estabelecidas. A seguir, são apresentadas as definições e características de cada fenótipo:

## 1. Linhagem Clássica(cKv):

As linhagens clássicas de *K. variicola* incluem isolados sensíveis e multirresistentes aos antimicrobianos, que não apresentam produção excessiva de cápsula, caracterizando-se pelo fenótipo não hiper mucoviscoso (RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019). Essas estirpes compartilham fatores de virulência com *K. pneumoniae* e têm sido associadas a infecções graves, como infecções da corrente sanguínea (BSIs), indicando a possível existência de fatores de virulência ainda não descobertos (MAATALLAH et al., 2014; PACZOSA; MECSAS, [s.d.]; ROSENBLUETH et al., 2004). Além disso, cepas *cKv* podem ser encontradas em ambientes clínicos e não clínicos, como plantas e água, demonstrando sua ampla distribuição ecológica (BARRIOS-CAMACHO et al., 2019). No presente estudo, os isolados Kv15, Kv35 e Kv57 se enquadram na classificação de fenótipo clássico (*cKv*), conforme descrito por Campos et al 2021. Esses isolados, embora não apresentem características associadas à hipervirulência, como os genes *rmpA* e *rmpA2*, destacam a relevância clínica das linhagens clássicas, especialmente no contexto da resistência a múltiplos antimicrobianos (MDR). Essa diferenciação entre linhagens clássicas e hipervirulentas é fundamental para elucidar o impacto clínico de cada fenótipo (HVKPIG, 2018).

## 2. Linhagem Hiper mucoviscosa(hmvKv):

Essas linhagens apresentam o fenótipo hiper mucoviscoso, detectado por testes de viscosidade em colônia, mas, diferentemente das cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae*, são negativas para os genes *rmpA* e *rmpA2*. Esse fenótipo levanta questões sobre o papel da hiper mucoviscosidade na ausência de outros fatores genéticos relacionados à hipervirulência(LEE et al., 2017; RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019). Embora ainda pouco

caracterizadas, as cepas *hmvKv* indicam um fenótipo único em *K. variicola*, que pode estar associado a mecanismos alternativos de adaptação e virulência (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017).

### 3. Linhagem Hipervirulenta(hvKv):

Definidas por sua associação com taxas de mortalidade mais elevadas, comparáveis ou superiores às cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* em modelos experimentais (MAATALLAH et al., 2014; POTTER et al., 2018), linhagens *hvKv* apresentam genes de sideróforos como *yersiniabactina*, *aerobactina* e *salmochelina*, além dos reguladores do fenótipo mucóide (*rmpA* e *rmpA2*) localizados em grandes plasmídeos, que são fatores cruciais para a hipervirulência (BIALEK-DAVENET et al., 2014; BRIEF; KLEBSIELLA, 2019). Esses isolados também demonstram alta capacidade de causar infecções em diferentes modelos murinos, incluindo infecções do trato urinário e pulmonares, reforçando seu elevado potencial patogênico (HVKPIG, 2018; LU et al., 2018; WU et al., 2017). Estudos indicam que esses fenótipos podem ser influenciados por configurações genômicas únicas em *K. variicola*, ainda não totalmente compreendidas, exigindo maior investigação (CUBERO et al., 2016).

A classificação em fenótipos clássicos, hipermucoviscosos e hipervirulentos em *K. variicola* representa um avanço na compreensão de sua relevância clínica e ecológica. Entretanto, mais estudos são necessários para explorar as bases genéticas e funcionais que sustentam essa diversidade, com foco na identificação de novos biomarcadores que auxiliem no diagnóstico e manejo clínico dessas linhagens (POMAKOVA et al., 2012; SHON; BAJWA; RUSSO, 2013; STRUVE et al., 2015).

## **Perspectivas futuras**

Ainda há lacunas significativas no entendimento dos mecanismos de virulência e patogenicidade de *K. variicola*. Embora alguns fatores de virulência compartilhados com *K. pneumoniae* já tenham sido bem descritos, é provável que *K. variicola* apresente genes exclusivos ou configurações genéticas distintas que desempenhem um papel crítico em sua adaptação e virulência em diferentes hospedeiros.

Como o genoma de *K. variicola* é considerado plástico, sua capacidade de adquirir genes por transferência horizontal é um fator importante na emergência de linhagens mais virulentas ou resistentes. A investigação funcional desses novos genes e sua relação com fatores de virulência conhecidos poderá oferecer uma compreensão mais aprofundada sobre o impacto clínico de *K. variicola* em diferentes cenários de infecção (CAMPOS et al., 2021; POTTER et al., 2018; RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019).

Estudos futuros que combinem análises genômicas, fenotípicas e experimentos em modelos animais podem revelar novos fatores de virulência e resistência, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle e tratamento das infecções causadas por *K. variicola*.

## **Metabolismo de carboidratos e fontes de carbono**

O metabolismo de carboidratos é um elemento essencial para a adaptação de bactérias a diferentes ambientes e para a modulação de sua virulência. A utilização de fontes de carbono pode ocorrer por meio de estratégias como diauxia (consumo sequencial) ou co-utilização, fenômenos regulados por mecanismos moleculares que otimizam a alocação de recursos metabólicos em resposta às condições ambientais (WANG et al., 2019). Esses processos, muitas

vezes mediados pela repressão catabólica por carbono (CCR), desempenham um papel fundamental no equilíbrio entre crescimento bacteriano e expressão de fatores de virulência. Exemplos disso incluem *Salmonella entérica* e *Klebsiella pneumoniae*, cujos mecanismos regulatórios têm sido amplamente estudados (POKORZYNSKI; GROISMAN, 2023; WANG et al., 2019).

A repressão catabólica por carbono (CCR) é um dos principais mecanismos regulatórios que permitem às bactérias responder de forma eficiente à presença de múltiplas fontes de carbono no ambiente. Em enterobactérias como *K. pneumoniae* e *K. variicola*, esse processo é geralmente mediado pelos sistemas CRP-cAMP e PTS (sistema de transporte de fosfotransferase), que atuam inibindo a transcrição de genes envolvidos na metabolização de substratos menos preferenciais, sempre que uma fonte altamente energética, como a glicose, estiver disponível (WANG et al., 2019; POKORZYNSKI; GROISMAN, 2023). Esse controle coordenado favorece a priorização do metabolismo da glicose e reduz o custo metabólico associado à expressão de rotas catabólicas redundantes.

Além de regular o metabolismo central, o CCR está intimamente ligado à expressão de genes de virulência. Em *K. pneumoniae*, foi demonstrado que a presença de glicose – por meio do CCR – reprime fatores de virulência específicos enquanto favorece a produção de cápsula em determinadas condições (FAN et al., 2023). Em *K. variicola*, embora os mecanismos estejam ainda em caracterização, a presença de homólogos dos principais reguladores do CCR sugere que esse sistema também desempenha papel crucial na modulação da virulência. Assim, compreender como o CCR influencia a hierarquia metabólica e a expressão de genes adaptativos pode favorecer *insights* sobre os fatores que favorecem o sucesso de linhagens patogênicas em diferentes nichos.

A rede metabólica de utilização de fontes de carbono em bactérias apresenta uma organização complexa, com diferentes substratos sendo incorporados em pontos distintos da glicólise e do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). A Figura 4 ilustra como diferentes fontes de carbono, incluindo glicose, sorbitol, maltose e galactose, são metabolizadas, destacando a existência de grupos distintos de substratos. Substratos do Grupo A (marcados em verde) podem ser utilizados simultaneamente com os do Grupo B (vermelho), enquanto pares de substratos do Grupo A frequentemente apresentam diauxia. Esse mecanismo reflete a priorização da glicose sobre outros açúcares via CCR, fenômeno amplamente descrito em enterobactérias e de grande relevância para *Klebsiella variicola*.

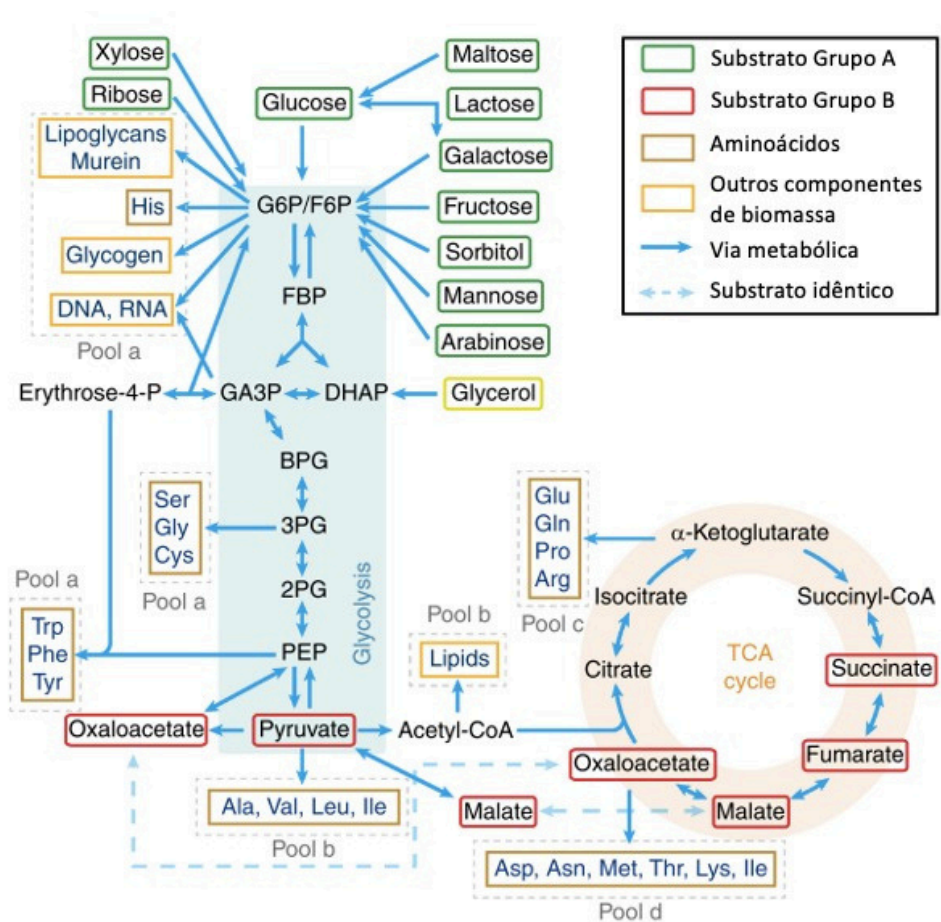


Figura 4. Rede metabólica da utilização de diferentes fontes de carbono em bactérias. Substratos do Grupo A (destacados em verde) podem ser utilizados simultaneamente com os do Grupo B (destacados em vermelho), enquanto pares do Grupo A geralmente apresentam diauxia. Os principais caminhos metabólicos estão representados, evidenciando a interconexão entre glicólise, o ácido tricarboxílico (TCA) e a biossíntese de componentes celulares. Os precursores de biomoléculas essenciais, como aminoácidos (moldura marrom) e outros componentes estruturais (moldura laranja) são agrupados em pools metabólicos(a-d, indicados por molduras tracejadas). Todas as fontes de carbono do grupo A entram na

via metabólica a partir da conversão de glicose-6-fosfato(G6P) para frutose-6-fosfato(F6P), enquanto os do grupo B são incorporados em diferentes pontos após a glicólise. Adaptado de Wang X et al 2019.

Os genes respiratórios e catabólicos estão distribuídos diferencialmente nos genomas microbianos, e fontes específicas de carbono podem favorecer diferentes processos respiratórios, influenciando não apenas a adaptação bacteriana ao hospedeiro, mas também a composição da comunidade microbiana e o conteúdo gênico (CARLSON et al., 2020). No complexo *Klebsiella*, cada genoma codifica entre 5.000 e 5.500 genes, dos quais aproximadamente 2.000 são conservados entre todos os membros da espécie (genes centrais), enquanto o restante é variável (genes acessórios) (HOLT et al., 2015). Somando os genes centrais e acessórios, estima-se que o pangenoma exceda 100.000 sequências de codificação de proteínas, associadas a diversas categorias funcionais, muitas ainda pouco caracterizadas (HAWKEY et al., 2022). Essa variação genética reflete-se na capacidade metabólica das linhagens do complexo *Klebsiella*, que apresentam diferenças significativas no uso de substratos, especialmente de carbono, o que influencia diretamente sua patogenicidade e virulência (BLIN et al., 2017; HAWKEY et al., 2022; NORSIGIAN et al., 2019).

Adicionalmente, em condições de limitação de carbono, bactérias ajustam suas taxas de manutenção metabólica, alocando recursos de forma mais eficiente para garantir a sobrevivência. Estudos em *Escherichia coli* indicaram que taxas de crescimento mais lentas levam a maior sobrevivência em períodos de privação, evidenciando a influência do metabolismo energético sobre a viabilidade celular (BISELLI; SCHINK; GERLAND, 2020). Esses ajustes metabólicos podem ser fundamentais para a capacidade de patógenos persistirem em ambientes desfavoráveis ou durante a colonização do hospedeiro.

No caso de *Klebsiella pneumoniae* e espécies relacionadas, como *Klebsiella variicola*, a manutenção da cápsula bacteriana é altamente influenciada por condições nutricionais. Em

ambientes ricos em nutrientes, a cápsula pode ser reduzida devido ao alto custo metabólico, enquanto em ambientes pobres, como em condições limitadas de glicose, ela oferece uma vantagem competitiva ao proteger contra estresses abióticos e imunológicos (LEE et al., 2016; WANG et al., 2019). Essa característica reflete a plasticidade metabólica e adaptativa do gênero *Klebsiella*, que se manifesta em sua capacidade de formar biofilmes e modular a virulência em resposta ao ambiente.

Além disso, a glicose tem um papel central na modulação da resistência antimicrobiana em *Klebsiella pneumoniae*. Conforme ilustrado na Figura 5, a glicose pode induzir resistência às polimixinas ao promover o aumento da produção de cápsula e manter elevados os níveis de ATP. Esses efeitos ocorrem por meio da supressão da expressão do regulador *crp*, que controla negativamente genes envolvidos na biossíntese de polissacarídeos capsulares. Assim, em ambientes com disponibilidade de glicose, a ativação da via glicolítica e do ciclo do TCA favorece a resistência antimicrobiana e aumenta a capacidade de sobrevivência bacteriana (FAN et al., 2023).

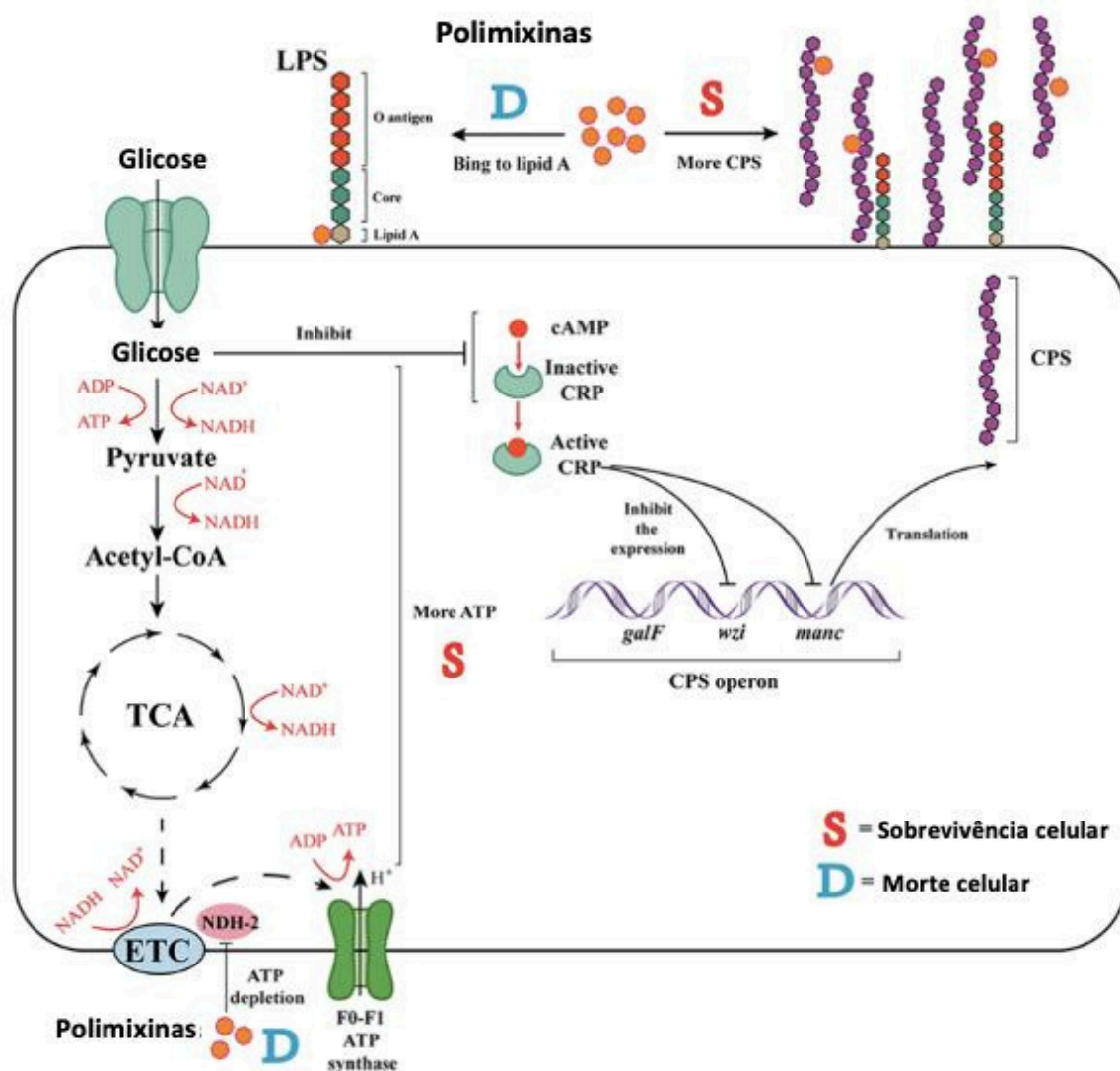


Figura 5. Modelo proposto de resistência induzida por glicose às polimixinas em HiA1c *Klebsiella pneumoniae*. As polimixinas podem se ligar eletrostaticamente ao lipídio A ou inibir a NADH-quinona oxidoreductase tipo II (NDH-2), levando ao vazamento do conteúdo contido no citoplasma e à depleção de ATP, o que contribui para a morte celular (D). A glicose induz resistência bacteriana às polimixinas por dois mecanismos: (i) inibição da expressão do gene *crp*, provendo a produção de polissacarídeos capsulares (CPS) e aumentando a resistência antimicrobiana, e (ii) manutenção de níveis elevados de ATP por meio da ativação da glicólise, do ciclo ácido tricarboxílico (TCA) e da cadeia de transporte de elétrons (ETC), aumentando a sobrevivência celular. Adaptado de Fan et al 2023.

O equilíbrio entre o metabolismo de carboidratos e a virulência em patógenos está intrinsecamente relacionado à expressão de genes regulados por sistemas como CRP-cAMP e PTS. Esses sistemas não apenas controlam a priorização de carbono, mas também regulam fatores de virulência em resposta à disponibilidade de nutrientes, destacando uma interdependência entre metabolismo e patogênese (POKORZYNSKI; GROISMAN, 2023).

Compreender como os padrões de uso de substratos influenciam a virulência e identificar pontos metabólicos universais ou específicos no metabolismo de linhagens clonais, associados a genes ou proteínas essenciais, pode direcionar para novas abordagens terapêuticas relacionadas à resistência antimicrobiana e à identificação de *K. variicola*. Dessa forma, a presente tese busca explorar como o metabolismo de diferentes carboidratos influencia na virulência de *Klebsiella variicola*, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias inovadoras no combate a infecções bacterianas.

## **Justificativa**

A identificação equivocada de *Klebsiella variicola* tem contribuído para a escassez de estudos sobre os mecanismos de patogenicidade associados aos processos patológicos desencadeados por essa espécie. Nesse contexto, investigações que busquem identificar fatores de virulência e os processos associados à sua expressão são fundamentais para compreender os mecanismos bacterianos envolvidos na colonização e infecção do hospedeiro.

As enterobactérias colonizam o trato gastrointestinal utilizando uma ampla diversidade de fontes de sacarídeos para crescimento e manutenção da viabilidade na microbiota intestinal. Paralelamente, a presença de sacarídeos em ambientes extraintestinais também favorece a capacidade de colonização bacteriana e está diretamente relacionada ao estabelecimento de infecções. Dessa forma, compreender a influência de diferentes açúcares na modulação de fatores de virulência de *K. variicola* permitirá uma melhor caracterização dos mecanismos envolvidos na colonização e patogênese dessa espécie, além de oferecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

## **Objetivos**

### **Objetivo Geral**

Investigar o efeito da utilização de carboidratos na expressão de fatores de virulência e patogenicidade de linhagens de *Klebsiella variicola* isoladas de infecções humanas.

### **Objetivos Específicos**

- Avaliar o *fitness* bacteriano em diferentes fontes de carbono;
- Investigar a influência de diferentes fontes de carbono na produção de biofilmes;
- Analisar a influência de fontes de carbono previamente selecionadas na produção de sideróforos;
- Influência de fontes de carbono na capacidade de sobrevivência em soro humano;
- Avaliar a expressão do gene fimbrial *mrkA* em resposta ao cultivo em diferentes fontes de carbono por qRT-PCR.

## Desenho Experimental:

O trabalho visou identificar a influência da utilização de diferentes carboidratos na expressão de fatores de virulência de linhagens de *K. variicola* e foi executado em 2 etapas:

A primeira etapa consistiu em avaliar a capacidade das linhagens bacterianas em utilizar diferentes carboidratos como fontes de carbono únicas determinando-se o *fitness* e a produção de biofilme. Carboidratos que promoveram maior taxa de crescimento bacteriano e maior biomassa em biofilme foram selecionados para a continuidade do trabalho;

A influência dos carboidratos selecionados na expressão de genes de virulência foi avaliada em diferentes condições experimentais, incluindo: crescimento em suspensão na fase log, biofilme maduro (5 dias), resistência ao soro humano, produção de sideróforos e expressão do gene fimbrial *mrkA* por PCR quantitativa em tempo real.

O desenho experimental está representado na figura 6.

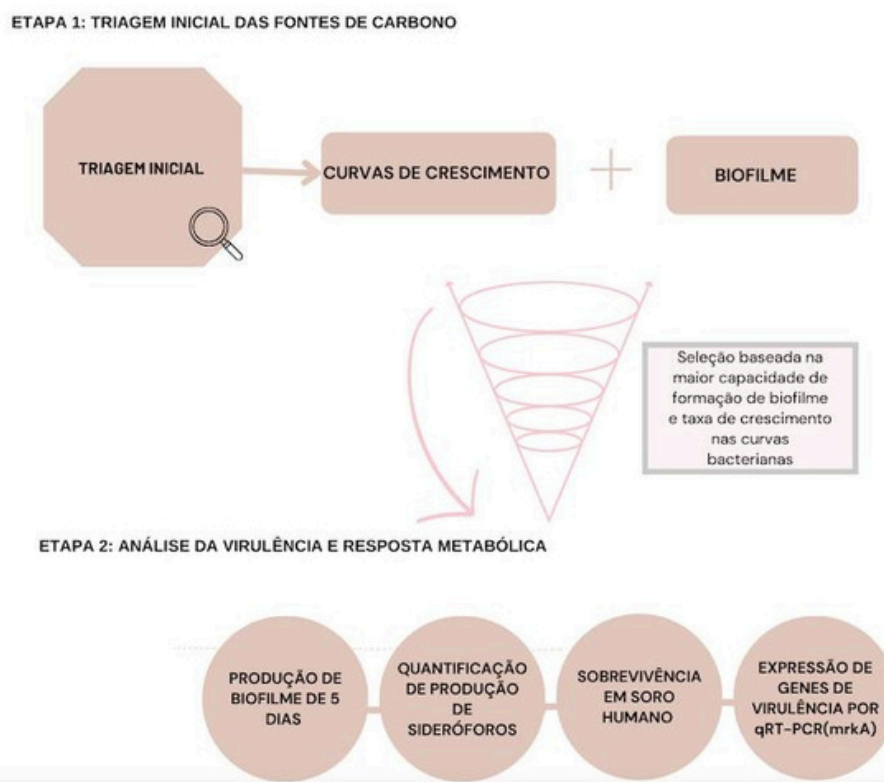


Figura 6.. Esquema experimental representando as etapas de triagem e análise de virulência em isolados de *Klebsiella variicola*. Na etapa 1, diferentes fontes de carbono foram submetidas a testes de crescimento bacteriano (curvas de crescimento) e formação de biofilme (24h), compondo a triagem inicial. As condições que apresentaram maior taxa de crescimento e maior capacidade de formação de biofilme foram selecionadas para a etapa 2. Nesta fase, foram conduzidos experimentos funcionais de avaliação da virulência e resposta metabólica, incluindo produção de biofilme por 5 dias, quantificação de sideróforos, ensaio de sobrevivência em soro humano e expressão do gene de virulência *mrkA*.

## Material e Métodos

### 1. Isolamento, cultivo e armazenamento das linhagens bacterianas

As três estirpes de *K. variicola* incluídas no presente estudo, denominadas Kv15, Kv35, Kv57, foram isoladas no Hospital Universitário de Brasília (HUB), entre setembro de 2013 e dezembro de 2017. As linhagens foram coletadas a partir de urocultura, hemocultura e cateter de pacientes, respectivamente. Após isolamento, cada linhagem foi cultivada durante 18 horas em meio LB (Sigma- Aldrich) a 37°C e armazenadas em freezer -80°C em LB 50% Glicerol (500uL/500uL).

Tabela 1. Características fenotípicas e genotípicas das cepas de *Klebsiella variicola* analisadas neste estudo.

Cepa ID	Cultura de origem	Perfil de não susceptibilidade aos antimicrobianos	Genes de Resistência	Fatores de Virulência
Kv15	Urina	MDR	<i>oqxAB, fosA, bla<sub>LEN-9</sub>, amp<sup>H</sup>, acrAB</i>	Cápsula, enterobactina, fímbrias tipo 1 e 3, <i>acrR, ompK36, ompK37</i>
Kv35	Sangue	MDR	<i>oqxAB, fosA, bla<sub>LEN-2</sub>, amp<sup>H</sup>, acrAB</i>	Cápsula, enterobactina, fímbrias tipo 1 e 3, <i>acrR, ompK36, ompK37</i>
Kv57	Cateter	MDR	<i>oqxAB, fosA, bla<sub>LEN-2</sub>, amp<sup>H</sup>, acrAB</i>	Cápsula, enterobactina, fímbrias tipo 1 e 3, <i>acrR, ompK36, ompK37</i>

MDR: resistência múltipla às drogas.

### 2. Meios de cultura e condições de cultivo

Todos os meios de cultura utilizados foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos após preparo.

## 2.1 Luria Bertani (SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007)

Triptona .....	10,00g
Cloreto de sódio .....	10,00g
Extrato de levedura .....	05,00g
Água destilada .....	1000,00mL

## 2.2 Meio Mínimo (SAMBROOK, J.; RUSSELL, 2001)

Utilizado em experimentos cujo principal objetivo é a observação da fisiologia celular e a expressão gênica (PALIY; GUNASEKERA, 2007), o Meio Mínimo M9 é um meio de crescimento microbiano formado por elementos inorgânicos conhecidos como sais minerais mínimos M9, que pode ser suplementado com diferentes aminoácidos, vitaminas e fontes de carbono. O meio é composto por :

Fosfato de potássio monobásico anidro – $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	60,00g
Fosfato de potássio dibásico anidro – $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....	14,00g
Sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{SO}_4$ .....	20,00g
Sulfato de magnésio – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	02,00g
Citrato de sódio – Tribásico – $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	10,00g
Água destilada.....	1000,00mL

Para realização dos experimentos, o meio M9 foi suplementado com 2% dos açúcares listados na tabela 2.

Tabela 2. Fontes de carbono utilizadas nos experimentos.

<b>Açúcar</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Classificação</b>	<b>Fabricante</b>
<b>D-Glicose</b>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Monossacarídeo	SigmaAldrich
<b>D(-)Frutose</b>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Monossacarídeo	SigmaAldrich
<b>Lactose</b>	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Dissacarídeo	SigmaAldrich
<b>Sorbitol D(-)</b>	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Monossacarídeo	SigmaAldrich
<b>D(+Maltose</b>	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Dissacarídeo	SigmaAldrich
<b>D(+Galactose</b>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Monossacarídeo	SigmaAldrich

### 3. Curva de crescimento

A curva de crescimento bacteriana foi realizada com o objetivo de analisar a capacidade de sobrevivência e multiplicação de isolados clínicos usando diferentes fontes de carbono. Para esse fim, as linhagens bacterianas foram cultivadas em LB e em meio M9 suplementado com fontes de carbono a 37°C, até que seu valor de DO600nm atingisse 0,1 (SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007). Os valores de DO600nm foram medidos no espectrofotômetro Pharmacia LKB Ultrospec III (Pharmacia, LKB; DG Apeldoorn, Holanda). Em seguida, foram adicionados 50 µl da cultura bacteriana a 150 µl de seu respectivo meio de cultura esterilizado em uma placa de 96 poços de fundo chato. A placa foi então incubada a

37°C por 24 horas em condições aeróbicas e estáticas, com valores de DO600nm medidos a cada 30 minutos no Spectramax M3 (Molecular Devices, LLC; San Jose, Califórnia, EUA). Todas as curvas de crescimento foram realizadas em triplicata. Foram utilizados parâmetros como taxa de crescimento ( $\mu$ ) e tempo de geração (g). A taxa de crescimento ( $\mu$ ) foi calculada usando a

fórmula  $\mu = \ln(OD2) - \ln(OD1) / T2 - T1$ , onde OD2 é o valor DO600nm às 8 horas

determinadas como o tempo de fase do log médio e o DO1 é o DO600nm em 0 horas. O tempo T2 é o tempo de 8 horas e o T1 é de zero horas.

O tempo de geração foi calculado usando a fórmula  $g = \ln(2)/\mu$  onde  $\mu$  é a taxa de crescimento calculada.

#### **4. Quantificação da produção de biofilme em superfícies de poliestireno**

A quantificação da produção de biofilme foi realizada por meio da medida de densidade óptica, conforme descrito por (STEPANOVIĆ et al., 2007). O ensaio foi realizado em triplicata biológica e amostral. O teste de formação de biofilme na superfície do poliestireno foi realizado em LB médio e M9 suplementados com as fontes de carbono já mencionadas.

Cada isolado foi cultivado anteriormente nos diferentes meios de cultura com uma única fonte de carbono a 37 ° C até que o OD600 fosse 0,3. Em seguida, foram adicionados 150ul de meio de cultura estéril e 50ul de cada suspensão bacteriana a uma placa de poliestireno de 96 poços. A placa foi então incubada a 37 ° C por 24 horas para formação de biofilme. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com solução salina (0,9%). A fixação foi realizada colocando metanol por 15 minutos em cada poço. Então, o sobrenadante foi descartado e a placa foi deixada à temperatura ambiente até secar. Após a secagem, o Cristal Violeta foi adicionado por 5 minutos. Após esse período, o excesso de corante foi lavado com água corrente e a placa foi deixada à temperatura ambiente para secar. Após a secagem, 200 UL de ácido acético glacial (33%) foram adicionados para resolubilizar o biofilme. A densidade óptica foi então medida usando o espectrofotômetro de microplaca Spectramax a um comprimento de onda de 570nm.

Para o ensaio de biofilme de 5 dias, a temperatura de incubação da placa para a formação de biofilme foi de 25 ° C e o tempo de incubação foi de 5 dias.

Para quantificar a produção de biofilme, foi obtida uma média aritmética dos três valores de absorvância obtidos para cada amostra em cada triplicado biológico. Se o valor obtido foi menor ou igual ao valor obtido do controle negativo a cepa foi considerada não produtora de biofilme. Se o valor da média da triplicata apresentou um valor maior que o valor do controle negativo, mas menor ou igual a duas vezes o valor do controle negativo a cepa foi considerada produtora fraca de biofilme. Se o valor foi maior que duas vezes o valor do controle negativo, mas menor ou igual a 4 vezes o valor do controle negativo ela é considerada uma produtora moderada de biofilme. E por fim, se o valor obtido foi 4 vezes maior que o valor do controle negativo a cepa foi classificada como produtora de biofilme forte. Como descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Modelo utilizado para a classificação de produção de biofilme de acordo com a média aritmética obtida da triplicata da absorvância atingida na leitura do teste. VA: valor de absorvância obtido da amostra, DO: densidade ótica (STEPANOVIĆ et al.2004).

<b>Biofilme forte</b>	<b>Biofilme moderado</b>	<b>Biofilme fraco</b>	<b>Não produtora</b>
<b>VA &gt; 4x CN</b>	<b>4x CN ≥ VA &gt; 2x CN</b>	<b>2x CN ≥ VA &gt; CN</b>	<b>CN ≥ VA</b>

## **5. Quantificação da produção de sideróforo**

A síntese de sideróforos é um mecanismo regulado pela presença de ferro e, por esse motivo, as condições de crescimento bacteriano são essenciais para garantir a maior produção possível dessas moléculas. Portanto, é essencial que o meio de cultura tenha uma quantidade mínima de ferro para evitar a inibição da síntese de sideróforos por bactérias. Os sideróforos são encontrados no sobrenadante da cultura bacteriana e esse sobrenadante é usado em ensaios que permitem a quantificação de sideróforos com base em suas propriedades funcionais e biológicas. A quantificação da produção de sideróforos por isolados foi realizada

de acordo com (PAYNE, 1994) usando a técnica do Chrome Azurol S (CAS). Este método usa um complexo de corante de ferro que muda de cor quando o ferro é removido. Os sideróforos têm uma afinidade maior pelo ferro do que o corante; portanto, quando o ferro é capturado pelos sideróforos, há uma mudança de cor, de azul para amarelo.

Primeiro, os isolados foram cultivados em caldo de Muller Hinton (Kasvi) e incubados a 37 ° C por 18 horas. Em seguida, a densidade óptica a DO600nm foi ajustada para 0,1 e um novo inóculo foi feito em 10 ml de meio mínimo de SSD livre de ferro mais 2% de cada fonte de carbono, também sem ferro. Esse inóculo foi incubado em agitador a 37 ° C por 24 horas. Após esse período, a cultura crescida é centrifugada, o sobrenadante coletado e filtrado através de uma membrana de 0,22 µm para remover quaisquer células bacterianas. O filtrado obtido é então liofilizado. Posteriormente, o extrato liofilizado foi ressuspensão em 1 ml de meio SSD livre de ferro.

Para a próxima etapa, duas soluções foram preparadas. Solução 1 contendo 0,6 ml de HDTMA, 0,15 ml de solução de ferro e 0,750 ml de CAS. A solução 2 contém 0,43g de tubos, 0,625 ml de água miliQ e NaOH e a um volume de 10 ml. A solução 2 deve ter o pH ajustado para 6.8.

Em seguida, as soluções 1 e 2 foram misturadas para formar a solução 3. Usando uma placa de microdiluição de 96 poços, foram adicionados 100 µl do extrato liofilizado ressuspensão em SSD livre de ferro e 100 µl de solução 3. Em seguida, uma leitura do espectrofotômetro é realizada em um comprimento de onda de 630 nm (SpectraMax). Se houver a presença de sideróforos na amostra testada, eles sequestram o ferro e a amostra perde sua cor azul, tornando -se mais amarelada.

O meio mínimo SSD foi usado como um branco e a solução 3 como referência. O cálculo para obter a quantidade de sideróforos é dado pela fórmula  $[(AR - AS)/AR]*L00$ . Com a AR sendo a absorção da referência e AS como sendo a absorção da amostra testada.

## 6. Sobrevivência em soro humano

A abordagem descrita por Deleo et al., (2017) foi usada e adaptada para avaliar a taxa de sobrevivência de cepas bacterianas no soro humano. Amostras de sangue foram coletadas para obter o soro a ser usado no experimento. Foi feito um *pool* de soro humano de 3 doadores saudáveis. Por dezoito horas, as estirpes bacterianas foram pré-cultivadas em meio de cultura esterilizados a 37° C. Os isolados de *K. variicola* foram inoculados em meio mínimo M9 com glicose, sorbitol, galactose e maltose separadamente. Todos os isolados foram diluídos para um  $DO_{600nm}$  de 0,3 correspondente a aproximadamente  $10^8$  UFC/ml. As linhagens foram submetidas a centrifugação por quatro minutos em 12.000g, após o que o sedimento foi assumido em 550 ul de soro humano. Subsequentemente, a amostra foi abalada a 60 rpm em uma incubadora mantida a 37 ° C. Em cada momento, 10 ul da cultura de *K. Variicola* foram diluídos para  $10^{-4}$ . Dez microlitros das duas diluições finais foram plaqueados em MacConkey Ágar (Kasvi) e incubados por dez horas a 37 ° C. As amostras foram coletadas aos 0, 30, 60 e 120 minutos.

## 6. PCR quantitativa para RNA (qt-RT-PCR)

### 6.1 Desenho dos primers

O desenho dos primers foi realizado utilizando o programa Primer tools IDT. Foram desenhados primers para 2 genes. Para o gene *rrsH* (RNA ribossomal da unidade 16S) utilizado como controle de expressão interna. Primers para o gene *mrkA* (fimbria). As sequências dos primers mencionados estão descritas abaixo:

Tabela 4. Sequências dos primers utilizados para os genes *rrsH* e *mrkA*.

Gene	Primers
<i>rrsH</i>	GACGATCCCTAGCTGGTCTG
	GTGCAATATTCCCCACTGCCT
<i>mrkA</i>	GCGGATACTTACCTGAAACC
	TGCTTACGTCATCCTGTTTAG

### 6.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído de amostras preservadas em fenol a  $-80^{\circ}\text{C}$  a um OD de 0,3 e purificado usando o sistema de MiRNA e Miniprep de MiRNA RELIAPREP™ (Promega) conforme o protocolo do fabricante. A qualidade do RNA foi avaliada em géis de agarose a 1% e a concentração de RNA foi medida com um espectrofotômetro Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Uma alíquota de 1  $\mu\text{g}$  de RNA de cada tratamento e replicação foi usada para a síntese complementar de DNA (cDNA), usando o kit de transcriptase reversa SuperScript™ IV (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

A análise da expressão gênica foi realizada usando o Kit Green SYBR® Universal Itaqtm (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Cada reação de qPCR foi realizada em um volume final de 10 µl, contendo 2 µl de uma diluição de 1:20 de cada estoque de cDNA, 0,2 µM de cada iniciador e 5 µl do kit verde SYBR® universal Itaqtm. As amplificações de PCR foram realizadas em um termociclador de PCR em tempo real da ABI STEPEONETM (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com os seguintes parâmetros: uma fase inicial de duas etapas de 50 ° C por 2 min e 95 ° C por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 ° C por 15 s e recozimento e extensão do iniciador a 60 ° C por 60 s.

Três réplicas biológicas e três técnicas foram incluídas para cada gene. As temperaturas de fusão (TM) foram determinadas usando o software StepOne v2.3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

## **8. Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram conduzidas no GraphPad Prism v. 10.0 (GRAPH PAD SOFTWARE 2023), com testes de ANOVA one-way e Kruskal-Wallis para verificação de significância entre grupos.

## Resultados e Discussão:

### 1. Curva de crescimento bacteriano

As curvas de crescimento de cada linhagem foram obtidas após seus cultivos em meio de cultura LB e em M9 contendo diferentes carboidratos como fonte única de carbono. Após a obtenção da curva de crescimento, a taxa de crescimento bacteriano e o tempo de geração (g) foram calculados para cada condição de cultivo testada. A partir destes dados é possível identificar quais as condições de cultivo que geraram maior *fitness* bacteriano (Figura 6).

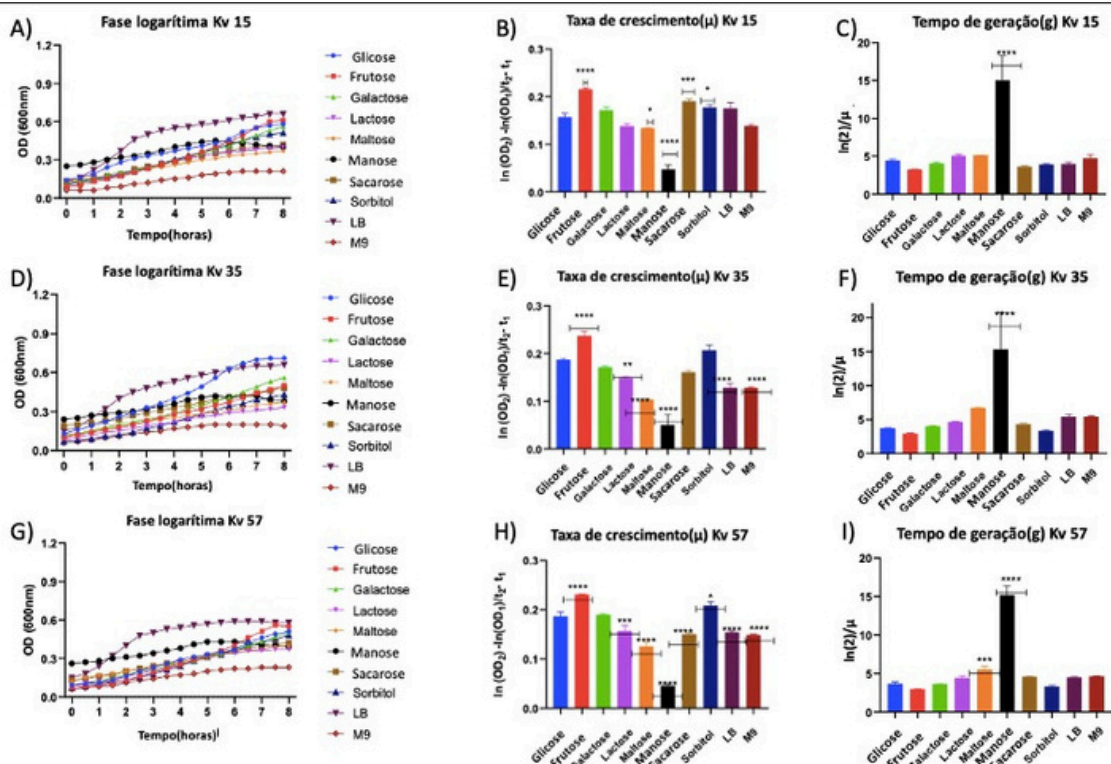


Figura 7. Crescimento de *Klebsiella variicola* em diferentes fontes de carbono. Os gráficos mostram a curva de crescimento (A, D, G), a taxa de crescimento (B, E, H) e o tempo de geração (C, F, I) para os isolados Kv 15, Kv 35 e Kv 57, respectivamente. Foram testadas várias fontes de carbono (glicose, frutose, galactose, lactose, maltose, manose, sacarose, sorbitol), juntamente com o meio controle (M9 e LB). Os dados destacam a influência das fontes de carbono no metabolismo bacteriano, mostrando variabilidade na adaptação metabólica entre os isolados. A análise estatística foi realizada usando ANOVA oneway. Asteriscos indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ) em comparação com a glicose como controle.

Assim, o impacto de diferentes fontes de carbono no crescimento, na taxa de crescimento e no tempo de geração de isolados de *Klebsiella variicola* foi avaliado. A glicose,

amplamente considerada a fonte de carbono preferida em muitas espécies-modelo, foi utilizada como controle positivo para os ensaios de curva de crescimento.

Dentre os carboidratos testados, a frutose, a sacarose e o sorbitol promoveram um crescimento significativamente maior do isolado Kv15 em comparação ao controle de glicose, enquanto a maltose e a manose resultaram em menor crescimento (Figura 6B). Notavelmente, a manose foi o único carboidrato que prolongou significativamente o tempo de geração em relação à glicose e ao meio mínimo M9, indicando uma menor taxa de crescimento (Figura 6C).

Variações significativas na taxa de crescimento e tempo de geração nas condições de cultivo testadas em relação ao controle de glicose também foram observadas para o isolado

Kv35, onde a lactose, a maltose, a manose, o meio LB e o M9 apresentaram taxas de crescimento reduzidas, enquanto a frutose promoveu o crescimento bacteriano mais rápido (Figura 6E). A manose exibiu o maior tempo de geração entre todos os substratos testados e foi o único carboidrato a mostrar uma diferença substancial em relação à glicose nesse parâmetro (Figura 6F).

O isolado Kv57 apresentou maior taxa de crescimento em cultivo de frutose e sorbitol, como fontes únicas de carbono. Contudo, quando cultivado em lactose, maltose, manose, meio LB e M9, a linhagem apresentou menor crescimento relativo à incubação da glicose (Figura 6H). Em termos de tempo de geração, a manose e a maltose resultaram nos tempos mais longos para a proliferação celular (Figura 6I). Esses resultados destacam a capacidade metabólica adaptativa da espécie em diferentes condições ambientais.

A colonização e sobrevivência bacteriana em ambientes dinâmicos, como o trato gastrointestinal, depende de sua adaptação metabólica (POKORZYNSKI; GROISMAN, 2023). Estudos demonstram que bactérias priorizam fontes de carbono que maximizam a eficiência do crescimento (GÖRKE; STÜLKE, 2008). No caso de *K. variicola*, as variações observadas no crescimento entre diferentes substratos podem refletir mecanismos regulatórios semelhantes à

repressão catabólica por carbono (CCR), um processo que controla a hierarquia de utilização de substratos com base na eficiência metabólica (WANG et al., 2019). Mesmo na presença de uma única fonte de carbono, sistemas reguladores como Cra (FruR) e o sistema de fosfotransferase (PTS) podem influenciar a taxa de consumo e a expressão gênica, otimizando a eficiência energética do metabolismo bacteriano (POKORZYNSKI; GROISMAN, 2023). Isso sugere que a preferência por frutose e sorbitol apresentada pelos isolados pode ser uma resposta regulada pelo metabolismo central, independentemente da competição entre substratos.

Bactérias utilizam preferencialmente substratos que proporcionam entrada rápida em vias metabólicas centrais, como a glicose e a frutose, que se convertem diretamente em glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P) na glicólise (WANG et al., 2019). Sob condições de crescimento diauxico, essa priorização se torna evidente, pois fontes de carbono mais eficientes reprimem o uso de substratos menos favoráveis por meio da CCR(WANG et al., 2019).

A capacidade de *K. variicola* de modular sua taxa de crescimento em resposta à disponibilidade de diferentes fontes de carbono evidencia seu potencial adaptativo a ambientes nutricionais variáveis. Estratégias como priorização de carbono ou produção aprimorada de cápsula podem ser fundamentais para a colonização e a persistência em condições de restrição nutricional, como observado no meio mínimo M9 (BUFFET; ROCHA; RENDUELES, 2021). Em ambientes intra-hospedeiros, como o trato gastrointestinal, o co-metabolismo de diferentes fontes de carbono pode influenciar a virulência e a transmissão bacteriana(HUDSON et al., 2022; POKORZYNSKI; GROISMAN, 2023). Além disso, a utilização diferencial de substratos pode impactar diretamente a formação de biofilme, um fator crítico para a patogenicidade de *Klebsiella spp.*(BUFFET; ROCHA; RENDUELES, 2021).

Por fim, a regulação da biossíntese da cápsula em *Klebsiella* tem sido demonstrada como diretamente influenciada pela disponibilidade de nutrientes (BUFFET; ROCHA;

RENDUELES, 2021). Em condições de abundância nutricional, a produção da cápsula pode ser reduzida, enquanto em ambientes limitados, como o meio M9, sua manutenção pode promover maior sobrevivência e evasão do sistema imunológico. Esses achados reforçam a necessidade de investigar a interface entre metabolismo e virulência em *K. variicola*, pois a disponibilidade de fontes de carbono não apenas sustenta o crescimento bacteriano, mas também pode afetar a dinâmica de colonização, a formação de biofilme e o comportamento patogênico (BUFFET; ROCHA; RENDUELES, 2021; GÖRKE; STÜLKE, 2008). A compreensão dessas interações pode fornecer *insights* cruciais sobre mecanismos de adaptação bacteriana e embasar estratégias terapêuticas direcionadas.

## **2. Produção de biofilme em superfície de poliestireno em 24 horas**

Todos os isolados de *Klebsiella variicola* produziram maior biomassa de biofilme nas condições testadas em comparação com o meio controle rico (LB). De acordo com a metodologia utilizada, o biofilme formado após 24 horas foi classificado como "forte" em todas as condições testadas. Dentre os açúcares avaliados, galactose, maltose, sacarose e sorbitol induziram maior produção de biofilme. Por outro lado, o meio suplementado com glicose, utilizado como controle entre os açúcares, apresentou a menor formação de biofilme entre os isolados testados. (Tabela 5).

Tabela 5. Média e desvio padrão de DO (570 nm) na formação de biofilme de 24 horas de cepas bacterianas em meio M9 contendo 2% das diferentes fontes de carbono e em meio Luria Bertani (LB)

Fonte de carbono	Kv 15 (Média ± DP)	Kv 35 (Média ± DP)	Kv 57 (Média ± DP)
<b>M9 + 2% Glicose</b>	0,410 ± 0,160	0,813 ± 0,127	0,680 ± 0,120
<b>M9+ 2% Frutose</b>	0,946 ± 0,097	1,160 ± 0,504	0,883 ± 0,240
<b>M9 + 2% Galactose</b>	1,500 ± 0,567	1,416 ± 0,397	1,173 ± 0,140
<b>M9 + 2% Lactose</b>	1,256 ± 0,516	1500 ± 0,754	1,380 ± 0,470
<b>M9 + 2% Manose</b>	0,817 ± 0,077	1,167 ± 0,200	1,200 ± 0,133
<b>M9 + 2% Sacarose</b>	1,486 ± 0,590	1,983 ± 0,665	1,326 ± 0,620
<b>M9 + 2% Sorbitol</b>	1,230 ± 0,554	1,423 ± 0,473	1,590 ± 0,230
<b>Luria Bertani (LB)</b>	0,246 ± 0,141	0,266 ± 0,119	0,200 ± 0,08

DP: desvio padrão.

Os açúcares que induziram maior formação de biofilme (Tabela 5), galactose, maltose, e sorbitol, convergem para um ponto metabólico comum na via glicolítica, especificamente glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P)(WANG et al., 2019). Esses intermediários desempenham um papel central no metabolismo energético e na biossíntese de polissacarídeos extracelulares (EPS), os quais são componentes essenciais da matriz do biofilme. A entrada preferencial de carbono nesses pontos pode favorecer a ativação de vias regulatórias envolvidas na produção de EPS e adesão bacteriana. Em *K. pneumoniae*, substratos similares, como L-fucose, demonstraram modular positivamente a formação de biofilme e hiper mucoviscosidade por meio da regulação da expressão de genes de adesão(HUDSON et al., 2022). Assim, a eficiência metabólica desses açúcares pode estar diretamente relacionada à robustez do biofilme observado em *K. variicola*.

A regulação diferencial dos genes *mrkA* e *mrkD*, que codificam componentes das fímbrias tipo 3, essenciais para a adesão e estruturação do biofilme, pode contribuir para esse fenômeno(ASHWATH et al., 2022). Além disso, a regulação da formação de biofilme pode ser modulada pelo sistema de *quorum sensing* SdiA, que afeta a expressão de fímbrias e a interação celular (LI; NI, 2023). O sistema CRP-cAMP também desempenha um papel importante na

modulação da transição entre crescimento planctônico e biofilme, controlando a expressão das fímbrias tipo 3 e a sinalização via c-di-GMP (LI; NI, 2023).

A formação reduzida de biofilme no meio contendo glicose como fonte exclusiva de carbono pode estar associada à repressão catabólica por carbono (CCR), um mecanismo amplamente descrito para *Enterobacteriaceae* (WANG et al., 2019). Esse processo ocorre quando a presença de uma fonte de carbono preferencial, como a glicose, modula negativamente a expressão de genes envolvidos na utilização de substratos alternativos e pode impactar a regulação de fatores de virulência e biofilme (LI; NI, 2023). O operon *mrkHIIJ*, responsável pela regulação do gene *mrkA*, é influenciado pelos níveis intracelulares de c-di-GMP, e a redução dessa molécula pode impactar negativamente a formação de biofilme em algumas condições metabólicas (LI; NI, 2023).

Além disso, a formação de biofilme em *K. pneumoniae* é fortemente influenciada pelo operon fimbrial *mrkABCD*, especialmente pela expressão de *mrkA*, que está associada a um aumento da biomassa do biofilme e à resistência a agentes biocidas (C et al., 2022). Embora a regulação do biofilme em *K. variicola* ainda não tenha sido totalmente elucidada, a alta formação observada nos isolados testados sugere que mecanismos semelhantes possam estar envolvidos.

A composição química dos polissacarídeos capsulares também pode impactar a estrutura e adesividade do biofilme. Estudos demonstram que diferentes perfis capsulares estão associados à variação na adesão celular e interação com superfícies abióticas, influenciando a formação do biofilme (DOS SANTOS GONCALVES et al., 2014). A regulação da cápsula por genes como *wcaG*, previamente associada ao aumento da formação de biofilme em *K. pneumoniae* (ZHENG et al., 2018), pode desempenhar um papel semelhante em *K. variicola*.

A escolha da fonte de carbono pode impactar significativamente a formação de biofilme. Estudos indicam que a utilização preferencial de certos açúcares pode modular a transição

metabólica das células bacterianas, influenciando a produção de matriz extracelular e a adesão às superfícies(WANG et al., 2019). Além disso, mecanismos de co-utilização de substratos podem explicar diferenças observadas entre os açúcares testados, onde certas fontes promovem maior biofilme devido a um melhor aproveitamento metabólico e ativação de vias de sinalização específicas (LI; NI, 2023; WANG et al., 2019).

A relação entre metabolismo, virulência e regulação genética do biofilme em *K. variicola* ainda precisa ser mais explorada, mas os dados apresentados reforçam seu potencial patogênico e adaptativo, especialmente em ambientes com disponibilidade limitada de nutrientes.

### **3. Produção de biofilme em superfície de poliestireno em 5 dias**

Os resultados obtidos no ensaio de biofilme em 24 horas de incubação foram utilizados para selecionar 4 carboidratos como fonte única de carbono a fim de se avaliar suas influências na produção de biofilme, produção de sideróforos, sobrevivência em soro humano e expressão de genes de virulência: glicose, sorbitol, galactose e maltose.

Inicialmente o ensaio de quantificação de biofilme produzido em 5 dias foi conduzido para avaliar sua maturação e robustez assim como para testar a influência das temperaturas ambientais (25°C) e intra-hospedeiro (37°C) em sua biomassa.

Uma linhagem de *K. variicola* isolada de um dente, caracterizada por suscetibilidade a um amplo espectro de antibióticos (NAKAMURA-SILVA et al., 2021)e por um fenótipo hiper mucoviscoso, foi utilizada como controle comparativo. Os dados obtidos indicaram que não houve influência da temperatura ou tempo na produção de biomassa do biofilme dos isolados de *K. variicola* (Figura7).

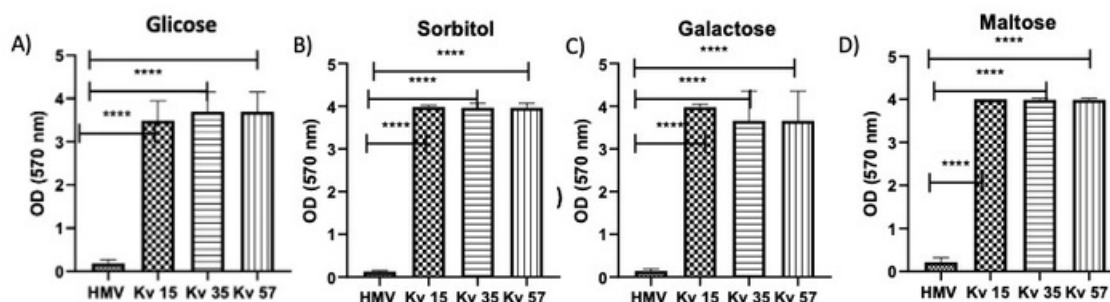


Figura 8. Formação de biofilme por *Klebsiella variicola* durante 5 dias em diferentes fontes de carbono. Os gráficos representam a densidade óptica(OD) a 570nm de biofilmes formados pelos isolados Kv 15, Kv 35, Kv 57 de *K. variicola* cultivados em meio mínimo(M9) suplementado com glicose(A), sorbitol(B), galactose(C) e maltose(D) como única fonte de carbono. A linhagem hiper mucoviscosa(HMV) foi utilizada como controle. As barras indicam a média e o desvio padrão das leituras de OD após a coloração com cristal violeta. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA, com  $p < 0,005$

Diferentemente do observado em *K. pneumoniae*, onde a formação de biofilme pode ser afetada por variações de temperatura (C et al., 2022), os isolados de *K. variicola* exibiram biofilme robusto e consistente tanto em temperaturas mais baixas quanto na temperatura padrão de incubação (37°C). Esse achado sugere que a formação de biofilme em *K. variicola* pode ter menor influência da temperatura, conferindo-lhe maior adaptabilidade e persistência em diferentes nichos ecológico. Além disso, estudos prévios indicam que a temperatura pode modular a expressão de genes estruturais da matriz extracelular e fatores de virulência em bactérias patogênicas (HOŠTACKÁ; ČIŽNÁR; ŠTEFKOVIČOVÁ, 2010; LI; NI, 2023), mas essa regulação parece não impactar a maturação do biofilme em *K. variicola*.

Um achado relevante foi a ausência de formação de biofilme pela linhagem hiper mucoviscosa (HMV), utilizada como controle. Embora essa linhagem seja caracterizada por uma cápsula espessa (NAKAMURA-SILVA et al., 2021), sua incapacidade de formar biofilme sugere que os mecanismos envolvidos na hiper mucoviscosidade podem não estar diretamente relacionados à adesão e maturação do biofilme. Esse resultado reforça a hipótese de que a hiper mucoviscosidade e a formação de biofilme são fenótipos regulados independentemente, como já foi observado em *K. pneumoniae*, onde cepas altamente capsuladas nem sempre apresentam biofilmes robustos (HUDSON et al., 2022; NAKAMURA-SILVA et al., 2021).

Embora os isolados testados de *K. variicola* sejam considerados clássicos, sem genes associados à hipervirulência como *rmpA* e *magA* (CAMPOS et al., 2021), eles produziram biofilme de forma considerável, o que pode favorecer sua capacidade de evasão ao sistema imune do hospedeiro. Esse achado reforça a importância da formação de biofilme como um fator relevante na persistência e adaptação da espécie em diferentes ambientes (GUERRA et al., 2022).

Além disso, a formação de biofilme por *K. variicola* pode ter implicações clínicas importantes, uma vez que a espécie tem sido identificada em infecções humanas e frequentemente subestimada devido à sua identificação errônea como *K. pneumoniae* (CAMPOS et al., 2021). A robustez do biofilme observado pode desempenhar um papel relevante na persistência da bactéria em ambientes hospitalares e na colonização de superfícies, reforçando a necessidade de mais estudos sobre os fatores que regulam esse processo (CHEN et al., 2020).

Os resultados indicam que a formação de biofilme em *K. variicola* pode ser influenciada por mecanismos regulatórios próprios, sem que necessariamente sigam o mesmo padrão descrito para *K. pneumoniae*. A ausência de biofilme na cepa hipermucoviscosa sugere que fatores associados à hipermucoviscosidade podem não estar diretamente ligados à adesão e maturação do biofilme, reforçando a necessidade de investigações adicionais sobre as interações entre cápsula, adesão e biofilme em *K. variicola*.

## **5. Quantificação da produção de sideróforos**

A Figura 8 detalha a produção de sideróforos pelos isolados nos gráficos A-D e por fonte de carbono nos gráficos E-H. Observou-se que a glicose favoreceu uma maior produção

de sideróforos de forma padronizada em todos os isolados (Figura 8A-D), sendo utilizada como controle no ensaio. Dentre os isolados, Kv 15 apresentou a menor produção de sideróforos na presença de glicose. Com exceção da linhagem HMV, a maltose também favoreceu a produção de sideróforos nos três isolados restantes, sem diferenças significativas em relação à glicose (Figura 8B-D, H). No caso do sorbitol, a produção foi menor no isolado HMV, enquanto na linhagem Kv 15 os níveis foram semelhantes aos da glicose e maltose (Figura 8F). Na galactose, a produção de sideróforos foi semelhante entre os isolados (Figura 8G). No entanto, embora os níveis fossem próximos, no isolado HMV a produção foi mais expressiva em comparação com os outros isolados, sendo superada apenas pela glicose (Figura 8A). Em contrapartida, nos isolados Kv 15, Kv 35 e Kv 57, a quantificação de sideróforos na galactose foi uma das menores observadas (Figura 8B-D).

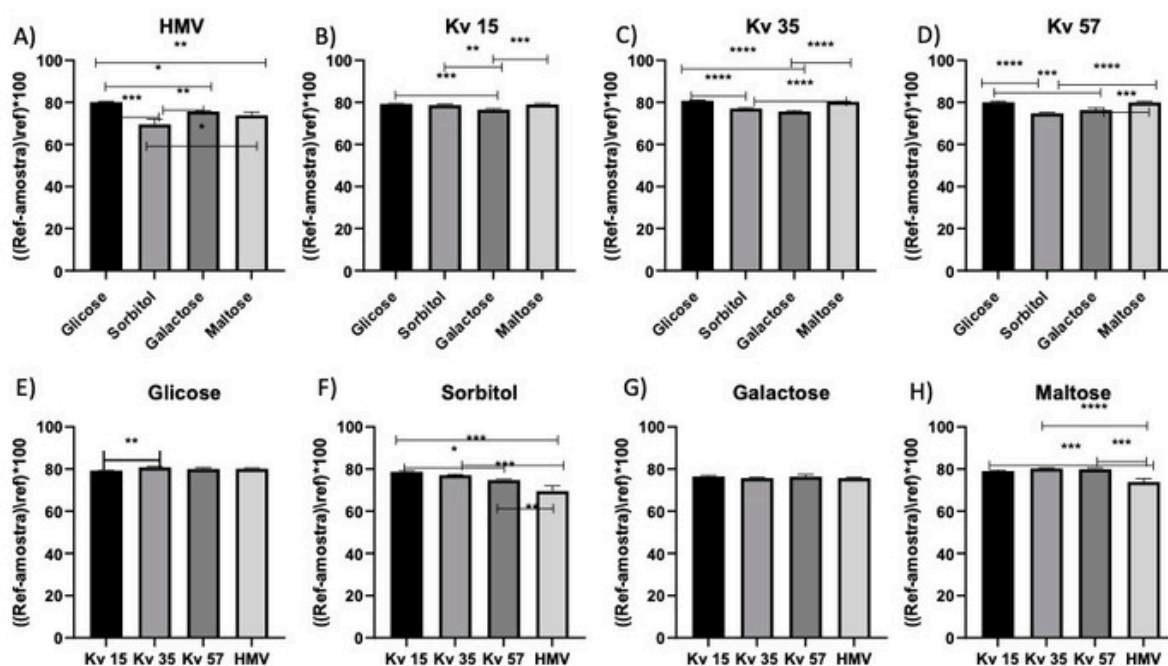


Figura 9. Quantificação de produção de sideróforos pelas linhagens de *Klebsiella variicola* HMV(A), Kv 15(B), Kv 35(C) e Kv 57(D) na glicose, sorbitol, maltose e galactose. A quantificação ocorre usando a fórmula  $((\text{ref-amostra})/\text{ref}) \cdot 100$ , com a ref sendo a absorção da referência e da amostra sendo a absorção da amostra testada. Em (e) temos a produção de sideróforos na glicose mostrando diferenças significativas na produção (\*). Em (f) a produção de sideróforos em sorbitol também com significância. Na (g) produção de galactose, que não se apresentou significativa entre a amostra. Em (h) a produção de sideróforo em maltose, apresentando diferenças significativas entre as amostras

O ferro é um elemento essencial para a sobrevivência e patogenicidade bacteriana, desempenhando um papel central em processos metabólicos como síntese e reparo do DNA, respiração celular, vias biossintéticas e regulação transcricional. No entanto, devido à propensão do ferro livre em participar da química de Fenton e gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), sua abundância deve ser rigorosamente regulada (EVSTATIEV, 2012). Em *Klebsiella spp.*, a disponibilidade e captação de ferro são determinantes essenciais para a adaptação bacteriana e a virulência (WANDERSMAN; DELEPELAIRE, 2004).

O regulador de captação de ferro (Fur) desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase do ferro e na regulação de fatores de virulência. Fur reprime a expressão dos genes *rmpA*, *rmpA2* e *rcaA*, que codificam reguladores-chave da biossíntese de polissacarídeos capsulares (CPS), de maneira dependente de Fe(II), prevenindo sobrecarga de ferro e subsequente formação de radicais hidroxila (LIN et al., 2011). Além disso, Fur atua como repressor de pelo menos oito sistemas de aquisição de ferro em *K. pneumoniae* CG43, permitindo respostas adaptativas a diferentes estímulos ambientais (LIN et al., 2011; TZOUVELEKIS et al., 2012).

Durante a infecção, o ferro do hospedeiro existe predominantemente como Fe(III), fortemente sequestrado por proteínas ligantes de ferro, como transferrina, lactoferrina, hemoglobina e mioglobina (WANDERSMAN; DELEPELAIRE, 2004). Para superar essa limitação, *K. pneumoniae* tem expressão elevada de genes de aquisição de ferro sob condições de estresse, como a exposição ao soro humano. A deleção de genes relacionados à produção de sideróforos reduz significativamente a virulência bacteriana, destacando a importância desses sistemas durante a infecção (HSIEH et al., 2008). Além da aquisição de ferro, os sideróforos desregulam a homeostase do ferro nas células do hospedeiro e interagem com outros metais, como cobre e zinco, influenciando a adaptação bacteriana e a interação com o hospedeiro

(ELLERMAN; ARTHUR, 2018; HOLDEN; BACHMAN, 2015). Essas moléculas atuam como fatores de virulência, inibindo mecanismos imunológicos do hospedeiro, incluindo a atividade de neutrófilos e outras respostas fagocíticas, facilitando a evasão imune e o estabelecimento da infecção (ELLERMAN; ARTHUR, 2018).

A disponibilidade de ferro no meio pode afetar diretamente a produção de sideróforos e a virulência bacteriana. Estudos demonstram que *K. pneumoniae* apresenta um aumento na formação de biofilme e redução da expressão de genes siderofóricos quando há excesso de ferro ambiental, sugerindo um mecanismo adaptativo para a utilização eficiente desse nutriente (CHEN et al., 2020). Esse fator pode ser relevante para avaliar se *K. variicola* possui regulação semelhante, especialmente sob a utilização de diferentes fontes de carbono.

Nossos resultados demonstram que a glicose promove uma elevada produção de sideróforos nos quatro isolados testados (Figura 8A-D,F). A preferência por glicose como substrato por *Klebsiella spp.* é amplamente documentada na literatura (LIN et al., 2011; WANDERSMAN; DELEPELAIRE, 2004), e a regulação metabólica pode influenciar a expressão de fatores de virulência, como a produção de sideróforos. No entanto, observou-se que a maltose (Figura 8H) também favoreceu significativamente a produção de sideróforos, sugerindo que essa fonte de carbono pode ser igualmente eficiente nesse processo. Além disso, verificou-se que, apesar de não apresentar os maiores valores absolutos de sideróforos, a utilização de sorbitol (Figura 8F) resultou em uma das maiores taxas de geração entre os isolados (Figura 6). Esse achado sugere que a eficiência de aquisição de ferro nesse meio pode estar associada ao sucesso reprodutivo das linhagens, contribuindo para um maior *fitness* bacteriano. Assim, a relação entre metabolismo do sorbitol e mecanismos de aquisição de ferro pode desempenhar um papel relevante na adaptação da *Klebsiella variicola* a diferentes ambientes (HOLDEN; BACHMAN, 2015).

Fatores ambientais, incluindo a fonte de carbono, podem influenciar a produção de sideróforos em bactérias. Um estudo publicado por (SRIVASTAVA et al., 2022), demonstrou que a variação de fontes de carbono e nitrogênio, pH e concentração de ferro e metais pesados pode otimizar a produção de sideróforos em bactérias associadas a plantas. Além disso, sob condições estressantes, como a exposição ao sistema complemento ou a disponibilidade limitada de nutrientes no meio, *Klebsiella* spp. pode modular a expressão de genes siderofóricos para otimizar sua sobrevivência e virulência (DAOUD et al., 2022; MUSELIUS et al., 2020). Muselius et al., 2020 demonstraram que *Klebsiella pneumoniae* ajusta seus mecanismos de aquisição de ferro em resposta a condições adversas, incluindo a regulação de proteínas associadas ao transporte e captação de ferro. Esses achados reforçam a hipótese de que *Klebsiella* spp. pode modular sua expressão de sideróforos para se adaptar a ambientes com escassez de ferro, maximizando sua persistência e virulência.

A relação entre fontes de carbono e sideróforos pode estar ligada à disponibilidade de energia e eficiência metabólica da bactéria em diferentes condições ambientais. A menor produção de sideróforos em sorbitol e maltose pode indicar uma resposta adaptativa, na qual a bactéria prioriza a utilização de substratos que demandam menos energia para metabolização, otimizando a eficiência enzimática e os processos de sinalização celular (HSIEH et al., 2008). Além disso, estudos sugerem que a associação entre repressão catabólica por carbono (CCR) e regulação de sideróforos pode ser um fator determinante na capacidade de *Klebsiella* spp. de modular a aquisição de ferro de acordo com a disponibilidade de nutrientes no ambiente (LIN et al., 2011).

Dentre as condições testadas, a glicose e a maltose foram as fontes de carbono que favoreceram a maior produção de sideróforos nos isolados analisados (Figura 8). Esse resultado sugere que esses carboidratos podem desempenhar um papel central na regulação da aquisição

de ferro em *Klebsiella variicola*. Além disso, observou-se que a maior produção de sideróforos esteve associada a condições que também favoreceram a formação de biofilme, conforme discutido anteriormente (Tabela 5). Esse achado reforça a relação entre a sideroforese e a capacidade de colonização e persistência bacteriana, uma vez que a aquisição eficiente de ferro é essencial para a manutenção de processos celulares críticos, incluindo a formação de biofilmes.

Ademais, as condições que induziram maior produção de sideróforos também foram associadas a menores tempos de geração nos isolados analisados (Figura 6), sugerindo que a aquisição de ferro pode estar diretamente relacionada ao sucesso reprodutivo e à adaptação metabólica da *Klebsiella variicola* em diferentes fontes de carbono. Esse achado reforça a hipótese de que a eficiência na captação de ferro pode estar relacionada ao rápido crescimento bacteriano, garantindo vantagem competitiva em diferentes ambientes.

Por fim, considerando que a disponibilidade de ferro no hospedeiro é limitada e que os sideróforos desempenham um papel crucial na virulência de *Klebsiella spp.*, a variação na produção dessas moléculas em diferentes fontes de carbono pode representar um mecanismo adaptativo em *K. variicola*. A menor produção em algumas condições pode indicar um efeito da repressão metabólica, onde a regulação de genes siderofóricos pode estar subordinada à disponibilidade de carbono e ferro simultaneamente (HSIEH et al., 2008; LIN et al., 2011). Estudos futuros deverão esclarecer se *K. variicola* apresenta mecanismos regulatórios distintos, especialmente em relação à repressão catabólica e à expressão de sistemas siderofóricos sob diferentes condições ambientais.

## 6.Sobrevivência bacteriana em soro humano

As linhagens de *Klebsiella variicola* utilizadas neste estudo foram previamente caracterizadas pelo nosso grupo de pesquisa, demonstrando sua capacidade de sobreviver e se multiplicar tanto no soro quanto no sangue (CAMPOS et al., 2021). Estudos anteriores indicaram que isolados de *K. variicola* exibem crescimento após 60 minutos de incubação (CAMPOS et al., 2021). No presente estudo, avaliamos a influência de diferentes fontes de carbono na sobrevivência e no crescimento desses isolados em soro humano (Figura 9). A glicose foi utilizada como substrato controle para a fonte de carbono, e o isolado HMV (NAKAMURA-SILVA et al., 2021) serviu como controle biológico para o microrganismo *K. variicola*.

Ao contrário do estudo anterior, os isolados não exibiram crescimento homogêneo após 60 minutos de incubação (Figura 9A, C, E, G). O isolado Kv 57 não apresentou crescimento nesse período, independentemente do substrato utilizado (Figura 9G). Em contraste, os isolados Kv 15 (Figura 9C) e Kv 35 (Figura 9E) demonstraram crescimento em meios contendo glicose e sorbitol após os 60 minutos de incubação, sugerindo que essas fontes de carbono favoreceram a sobrevivência e multiplicação bacteriana em soro humano.

Observou-se que a maltose influenciou positivamente o crescimento do isolado Kv 15, promovendo um aumento na contagem de células viáveis entre 60 e 120 minutos de incubação em soro (Figura 9C). Esse efeito foi particularmente notável em comparação com as demais fontes de carbono testadas, sugerindo que a maltose pode fornecer condições mais favoráveis para a sobrevivência e multiplicação dessa linhagem nesse ambiente. Além disso, diferentemente do que ocorreu em outras condições, onde houve uma queda inicial no número de CFU antes da recuperação do crescimento, o Kv 15 na maltose manteve um crescimento contínuo, sem redução na viabilidade celular após os primeiros 60 minutos. Esse padrão sugere

que a metabolização da maltose pode permitir uma transição mais eficiente para a fase de crescimento, evitando perdas celulares iniciais e favorecendo uma rápida adaptação da linhagem ao ambiente do soro.

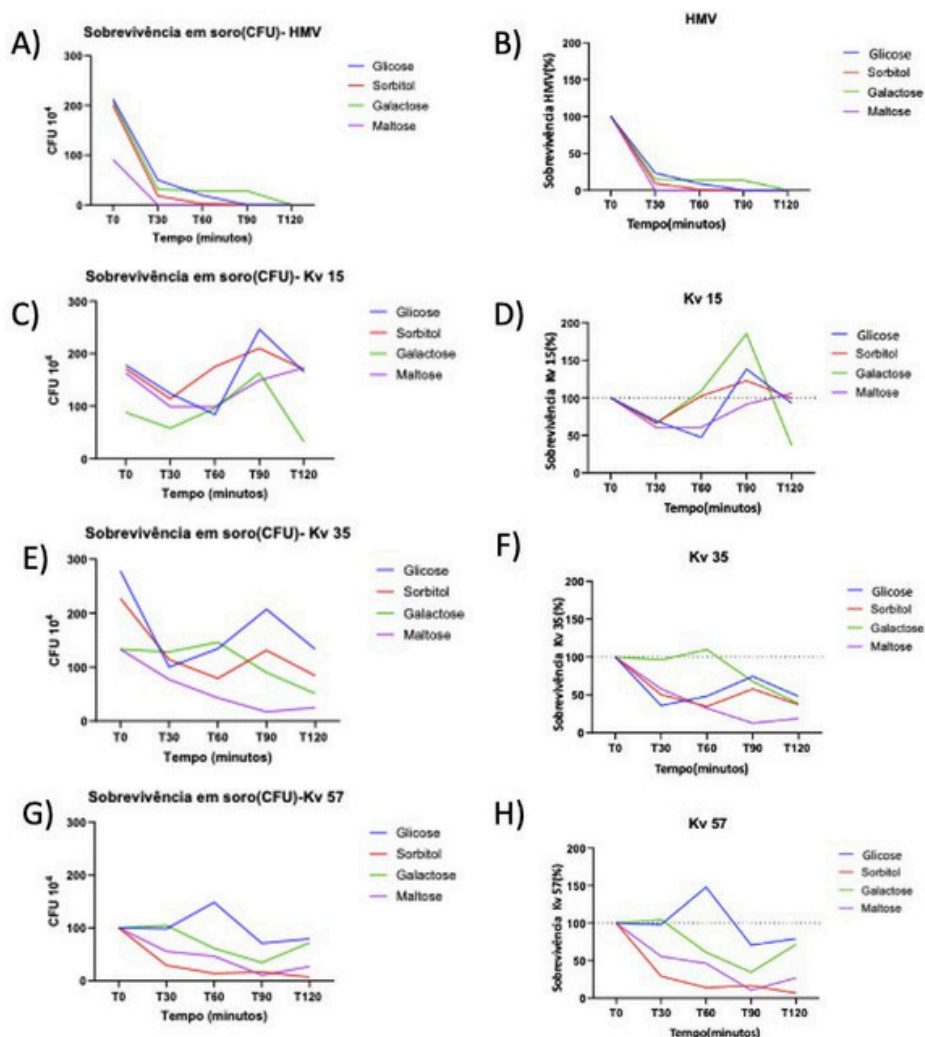


Figura 10. Sobrevivência dos isolados de *Klebsiella variicola* na incubação no soro humano por 120 minutos. Os isolados foram cultivados anteriormente em M9 suplementado com glicose, sorbitol, galactose ou manose. O resultado da CFU realizado com a incubação de HMV no soro é exibido em (a). A representação do resultado da sobrevivência do HMV na porcentagem é mostrada em (b). Para KV 15, em (c) a UFC de sobrevivência de sua linhagem no soro e em (d) o resultado em porcentagem de sobrevivência. A sobrevivência sérica do KV 35 é representada em (e) e em porcentagem em (f). Finalmente, a sobrevivência sérica para o KV 57 está representada em (g) e sua sobrevivência em porcentagem em (h)

A resposta imune inata do hospedeiro, mediada pelo sistema complemento do soro, é crucial para a eliminação microbiana. Esse sistema aprimora a função das células fagocíticas e pode lisar diretamente as bactérias por meio da formação do complexo de ataque à membrana.

Dois fatores de virulência amplamente estudados, a cápsula (CPS) e os lipopolissacarídeos (LPS), são os principais mecanismos associados à resistência de *Klebsiella* spp. a opsonização (OPOKU-TEMENG et al., 2022). Além disso, *Klebsiella* spp. pode expressar proteínas de superfície que inibem a ativação do complemento, reduzindo sua capacidade de eliminar a bactéria.

Curiosamente, a cepa hiper mucoviscosa (HMV), apesar de apresentar uma cápsula espessa, não sobreviveu ao soro humano (Figura 9A), enquanto os isolados não hiper mucoviscosos de *K. variicola* demonstraram maior resistência ao sistema complemento. Esse achado sugere que a hiper mucoviscosidade pode conferir proteção contra fagocitose, mas não necessariamente garantir resistência ao sistema complemento, reforçando que diferentes mecanismos de virulência podem atuar de maneira independente (NAKAMURA-SILVA et al., 2021). Estudos prévios indicam que a hiper mucoviscosidade pode comprometer a adesão a superfícies e modular a interação da bactéria com o sistema imune, impactando sua capacidade de sobrevivência em diferentes contextos (ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013; LEE et al., 2006). Assim, os isolados não hiper mucoviscosos podem apresentar um balanço entre adesão e evasão imune, utilizando estratégias distintas para persistência no hospedeiro.

Lin et al., 2006 observaram que *K. pneumoniae* pode resistir à morte induzida pelo soro na presença de altas concentrações de glicose. Estudos adicionais sustentam que a alta ingestão de açúcares prejudica a imunidade do hospedeiro, facilitando infecções bacterianas (DARBY et al., 2024; GILL et al., 2016; SURIANO et al., 2022). No presente estudo, todos os isolados pré-incubados em glicose apresentaram as maiores taxas de sobrevivência após 120 minutos, particularmente o Kv 15. Esse fenômeno pode estar relacionado à repressão catabólica por carbono (CCR), que regula a captação de glicose e reprime genes necessários para a utilização de fontes secundárias de carbono. Essa regulação, mediada por cAMP, não apenas favorece a

biossíntese da cápsula (CPS), mas pode influenciar a resistência ao complemento e a persistência da bactéria no hospedeiro.

Embora os isolados incubados em glicose tenham exibido maiores taxas de sobrevivência, outras fontes de carbono, como sorbitol e maltose, também sustentaram a sobrevivência bacteriana em soro humano, com exceção do isolado controle HMV. Assim como outras bactérias entéricas, *K. variicola* pode potencialmente metabolizar sorbitol como fonte alternativa de carbono. Fontes de carbono disponíveis no ambiente, como o sorbitol, amplamente utilizado em adoçantes (PIEKARA et al., 2020), podem ser exploradas por patógenos como *Klebsiella spp.*, o que reforça a importância de entender como diferentes substratos impactam sua adaptação.

Dentre os substratos testados, a maltose demonstrou ser a fonte de carbono que mais favoreceu os isolados, promovendo alta produção de sideróforos (Figura 8), elevada formação de biofilme (Figura 7) e maior sobrevivência em soro (Figura 9), especialmente para o isolado Kv 15. Por outro lado, a galactose teve o impacto mais negativo, apresentando a menor produção de sideróforos, alta formação de biofilme, mas reduzida viabilidade celular no soro.

Assim, a flexibilidade metabólica dos isolados estudados destaca uma vantagem competitiva importante para a adaptação e sobrevivência dessa espécie em ambientes diversos. A relação entre metabolismo de açúcares e evasão do complemento pode ser crucial para a persistência de *K. variicola* no hospedeiro, sugerindo que diferentes fontes de carbono podem afetar diretamente a resistência ao sistema imune e a virulência da bactéria. Esses achados reforçam a necessidade de investigações adicionais para compreender melhor os mecanismos que regulam essa interação.

## 7. Quantificação da expressão do gene *mrkA* por PCR quantitativa

A análise da expressão gênica por PCR em tempo real revelou variações significativas na regulação do gene *mrkA*, codificado pelo operon *mrkABCDF* e associado à formação de biofilme (ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013). Essas variações ocorreram em resposta às diferentes fontes de carbono—glicose, sorbitol, maltose e galactose—nos isolados de *Klebsiella variicola* Kv15, Kv35 e Kv57. O gene *rrsH* foi utilizado como controle basal para determinar a expressão relativa de *mrkA* (Figura 10).

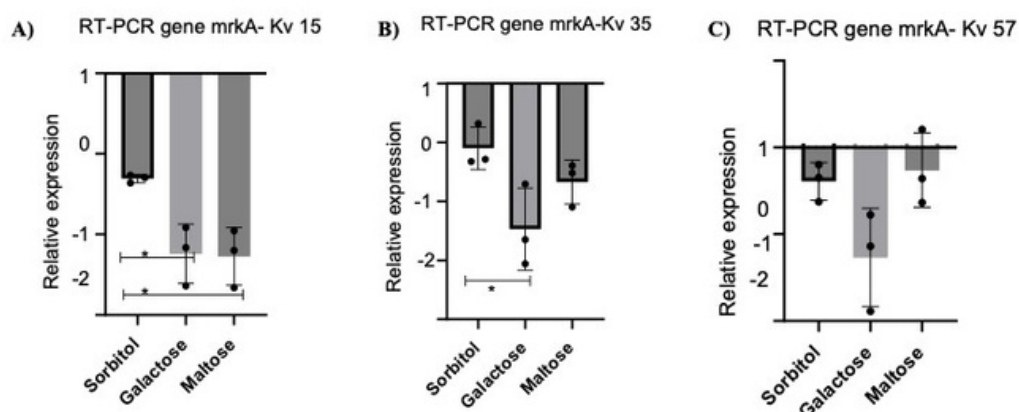


Figura 11. Expressão relativa do gene *mrkA* em isolados de *Klebsiella variicola* cultivados em diferentes fontes de carbono. A expressão foi quantificada por PCR em tempo real (RT-qPCR), normalizada pelo gene de referência e comparada ao controle cultivado em glicose. Os gráficos mostram a variação da expressão em meio contendo sorbitol, galactose e maltose para os isolados Kv 15 (A), Kv 35 (B) e Kv 57 (C). As barras representam a média e o desvio padrão da expressão relativa. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Nenhum dos isolados apresentou expressão detectável de *mrkA* na presença de glicose, sugerindo uma forte repressão gênica sob essa condição. Esse mecanismo, amplamente descrito em *Klebsiella pneumoniae*, está relacionado à repressão catabólica por carbono (CCR), que restringe a transcrição de genes de adesão e outros fatores de virulência na presença de glicose, devido à ativação da via CRP-cAMP (LIN et al., 2016). No entanto, a ausência de detecção de *mrkA* nos isolados de *K. variicola* contrasta com estudos anteriores em *K. pneumoniae*, onde a expressão do gene é reduzida, mas ainda detectável (GILL et al., 2016; LIN et al., 2016). Esse

achado sugere que *K. variicola* pode apresentar um controle mais rigoroso sobre a expressão de *mrkA* na presença de glicose, o que pode estar associado a estratégias regulatórias distintas para adaptação metabólica e virulência.

A regulação diferencial de *mrkA* foi evidente quando os isolados foram cultivados com fontes alternativas de carbono. O isolado Kv15 (Figura 10A) apresentou forte repressão de *mrkA* em todas as condições, sendo a maior redução observada em galactose e maltose. Em contraste, Kv35 (Figura 10B) exibiu uma resposta intermediária, com pequenas variações em sorbitol e galactose e leve redução em maltose. Notavelmente, Kv57 (Figura 10C) demonstrou a maior expressão de *mrkA* entre todos os isolados, independentemente da fonte de carbono utilizada, sugerindo que esse isolado é menos sensível à regulação por CCR e pode possuir mecanismos alternativos para ativação da adesão e formação de biofilme.

A diferença na regulação de *mrkA* entre *K. variicola* e *K. pneumoniae* pode estar associada a variações na modulação da via CRP-cAMP e na preferência metabólica da espécie. Estudos prévios demonstram que *K. pneumoniae* mantém níveis residuais de *mrkA* mesmo sob repressão por glicose, o que não foi observado nos isolados de *K. variicola* (LIN et al., 2016). Isso sugere que a fimbria tipo 3 pode ter um papel mais restrito em *K. variicola* e que a adaptação dessa espécie a diferentes nichos ecológicos pode estar mais relacionada à produção de cápsula do que à regulação de fimbrias (GILL et al., 2016; LIN et al., 2016).

A relação entre metabolismo de carboidratos e a expressão de *mrkA* também pode refletir adaptações específicas aos ambientes onde *K. variicola* é encontrada. Diferentes isolados exibiram respostas variáveis às fontes alternativas de carbono, o que pode indicar que a regulação de genes de adesão e biofilme não ocorre de maneira uniforme dentro da espécie. Esse padrão já foi descrito em *K. pneumoniae*, onde a interação entre a repressão catabólica e

a biossíntese de cápsula influencia a virulência e a capacidade de persistência em diferentes hospedeiros (GILL et al., 2016; LIN et al., 2016).

Embora a expressão de *mrkA* não tenha sido detectável na glicose, os isolados mantiveram uma capacidade significativa de formação de biofilme, o que sugere um mecanismo compensatório alternativo para adesão e persistência. Esse fenômeno pode estar relacionado à regulação da biossíntese da cápsula, como já observado em *K. pneumoniae*, onde a ativação da produção de cápsula pode suprimir a necessidade de fimbria tipo 3 para adesão (ALCÁNTAR-CURIEL et al., 2013; LIN et al., 2016).

Dessa forma, os resultados deste estudo reforçam a hipótese de que *K. variicola* emprega estratégias regulatórias distintas de *K. pneumoniae* para modular a adesão e formação de biofilme em diferentes condições metabólicas. Essa plasticidade regulatória pode refletir adaptações evolutivas que favorecem a colonização de nichos específicos e o desenvolvimento de infecções persistentes. Pesquisas futuras sobre os mecanismos moleculares subjacentes a essas diferenças poderão fornecer *insights* valiosos sobre a patogênese de *K. variicola* e contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas.

## Conclusões

O presente estudo investigou a influência de diferentes fontes de carbono na regulação de fatores de virulência em *Klebsiella variicola*, destacando o papel central do metabolismo de carboidratos na adaptação e patogenicidade dessa espécie emergente. A partir de uma abordagem multifatorial, envolvendo análises de crescimento, formação de biofilme, produção de sideróforos, expressão gênica e sobrevivência em soro humano, foi possível demonstrar que a escolha do substrato impacta diretamente a expressão de fenótipos relacionados à virulência.

A análise do crescimento bacteriano revelou uma plasticidade metabólica notável, com diferentes isolados apresentando desempenho variável frente às fontes de carbono testadas. Embora a glicose tenha sustentado um crescimento expressivo, outras fontes, como maltose, frutose e sorbitol, também se mostraram eficazes, dependendo da linhagem analisada. Essa flexibilidade indica que *K. variicola* é capaz de explorar rotas metabólicas alternativas de acordo com a disponibilidade de nutrientes, o que representa uma vantagem adaptativa em ambientes heterogêneos, como os encontrados no hospedeiro humano.

A formação de biofilme, fator essencial para colonização e persistência bacteriana, foi significativamente modulada pela fonte de carbono. Os resultados indicaram que substratos como maltose, sorbitol e galactose promoveram maior produção de biomassa do que a glicose, sugerindo que a repressão catabólica por carbono (CCR) interfere na expressão de genes estruturais relacionados à adesão, como *mrkA*. A ausência de formação de biofilme na cepa hiper mucoviscosa também evidenciou uma regulação independente entre os fenótipos de hiper mucoviscosidade e adesão, reforçando a complexidade regulatória dessa espécie.

A quantificação de *mrkA* por qRT-PCR sugere a influência do CCR, mostrando ausência de expressão em glicose e maior expressão em substratos alternativos como sorbitol e


galactose. Esses dados sugerem que *K. variicola* regula seus fatores de adesão de maneira distinta de *K. pneumoniae*, destacando sua plasticidade genética e metabólica.

A produção de sideróforos variou de acordo com a fonte de carbono, sendo mais elevada em glicose e maltose, o que sugere uma regulação interligada entre metabolismo e aquisição de ferro. Já a sobrevivência em soro humano foi consistentemente maior em glicose, possivelmente em função da ativação da biossíntese de cápsula e dos níveis elevados de ATP favorecidos por essa fonte energética. A cepa HMV, apesar de sua hiper mucoviscosidade, apresentou baixa viabilidade no soro e ausência de biofilme, indicando um perfil de virulência atípico.

De forma integrada, os dados demonstraram que o metabolismo de carboidratos influencia diretamente na expressão de diferentes estratégias de virulência, variando entre os isolados. Por exemplo, o isolado Kv15 destacou-se com maior produção de biofilme e sobrevivência em soro quando cultivado em maltose, enquanto Kv35 respondeu melhor à glicose. Já o Kv57 demonstrou alta produção de biofilme independentemente da fonte de carbono, mas baixa adaptação ao soro. A cepa HMV, por sua vez, mostrou elevado potencial para produção de sideróforos, mas desempenho inferior nos demais testes, reforçando a existência de mecanismos regulatórios específicos.

Esses achados revelam que o equilíbrio entre crescimento, adesão, aquisição de ferro e evasão imunológica é mediado por uma rede regulatória complexa, influenciada diretamente pelas condições nutricionais do ambiente. A modulação desses fatores por diferentes fontes de carbono demonstra que o metabolismo não apenas sustenta o crescimento celular, mas atua como regulador direto da patogenicidade.

Compreender essa interdependência entre metabolismo e virulência é crucial diante do atual cenário de emergência de cepas multirresistentes. Os resultados desta pesquisa não apenas contribuem para o entendimento da biologia de *K. variicola*, como também abrem caminho para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas voltadas à desestabilização metabólica de patógenos. Investigações futuras poderão explorar vias regulatórias específicas como alvos para intervenções clínicas, promovendo abordagens inovadoras no combate a infecções bacterianas e na contenção da resistência antimicrobiana.

Dr. Ana Flávia Alves Parente	Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, UnB. Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, UnB. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, UnB. Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, UnB. Affiliation
M <sup>sc</sup> . Raíssa Cristina Rocha Moreira da Silva	Biologia, UnB. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, UnB. Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, UnB. Affiliation
M <sup>sc</sup> . Laura Fernandes Louçã	Biologia, UnB. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, UnB. Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, UnB. Affiliation
M <sup>sc</sup> . Ana Paula Cardoso Almeida	Biologia, UnB. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, UnB. Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, UnB. Affiliation
<b>Authors</b>	
PDF Generation	10 Jun 2022 08:28:19 EDT by Alyson Rex
Submission Version	Initial Submission
Submission ID	2f29b9c9d-b217-4332-8111-6781b3a90b62
<b>Virulence's potential of Klebsiella variicola isolates</b> <b>Research article Title: The influence of carbohydrates on the</b> <b>Research Article</b>	
	
FOR CONSIDERATION IN INTERNATIONAL JOURNAL OF MICROBIOLOGY	Page 1 of 20

## Referências:

ALCÁNTAR-CURIEL, M. D. et al. Multi-functional analysis of *Klebsiella Pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 129–138, 2013.

ANGUS, D. C.; WAX, R. S. Epidemiology of sepsis: An update. **Critical Care Medicine**, v. 29, n.7 SUPPL., 2001.

ASHWATH, P. et al. Biofilm Formation and Associated Gene Expression in Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Specimens. **Current Microbiology**, v. 79, n. 3, p.73, 2022.

BARRIOS-CAMACHO, H. et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella variicola* obtained from different sources. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

BERRY, G. J.; LOEFFELHOLZ, M. J.; WILLIAMS-BOUYER, N. An investigation into laboratory misidentification of a bloodstream *Klebsiella variicola* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 2793–2794, 2015.

BIALEK-DAVENET, S. et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 11, p. 1812–20, nov. 2014.

BISELLI, E.; SCHINK, S. J.; GERLAND, U. Slower growth of *Escherichia coli* leads to longer survival in carbon starvation due to a decrease in the maintenance rate. **Molecular Systems Biology**, v. 16, n. 6, p. 1–13, 2020.

BLIN, C. et al. Metabolic diversity of the emerging pathogenic lineages of *Klebsiella pneumoniae*. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 1881–1898, 2017.

BOWERS, J. R. et al. KlebSeq, a diagnostic tool for surveillance, detection, and monitoring of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 2582–2596, 2016.

BRIEF, T.; KLEBSIELLA, C. crossm. p. 1–5, 2019.

BUFFET, A.; ROCHA, E. P. C.; RENDUELES, O. Nutrient conditions are primary drivers of bacterial capsule maintenance in *Klebsiella*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 288, n. 1946, 2021.

C, A. G.-T. A B et al. Prevalence of the fimbrial operon mrkABCD, mrkA expression, biofilm formation and effect of biocides on biofilm formation in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates belonging or not belonging to high-risk clones. **elsevier**, v. 60, n. 4, 2022.

CAMPOS, T. A. DE et al. Multidrug-Resistant (MDR) *Klebsiella variicola* Strains Isolated in a Brazilian Hospital Belong to New Clones. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. April, p. 1–11, 2021.

CARLSON, H. K. et al. Selective carbon sources influence the end products of microbial nitrate respiration. **ISME Journal**, v. 14, n. 8, p. 2034–2045, 2020.

CATALÁN-NÁJERA, J. C.; GARZA-RAMOS, U.; BARRIOS-CAMACHO, H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? **Virulence**, v. 8, n. 7, p. 1111–1123, 2017.

CHEN, T. et al. Effects of iron on the growth, biofilm formation and virulence of *Klebsiella pneumoniae* causing liver abscess. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1–7, 2020a.

CHEN, X. et al. The microbial coinfection in COVID-19. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 18, p. 7777–7785, 2020b.

CUBERO, M. et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007-2013). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 154–160, 2016.

DAOUD, L. et al. Elucidating the effect of iron acquisition systems in *Klebsiella pneumoniae* on susceptibility to the novel siderophore-cephalosporin cefiderocol. **PLoS ONE**, v.17, n. 12 December, p. 1–23, 2022.

DARBY, A. M. et al. High sugar diets can increase susceptibility to bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. **PLoS Pathogens**, v. 20, n. 8 August, p. 1–28, 2024.

DELEO, F. R. et al. Survival of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 in human blood. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, 2017.

DI, D. Y. W. et al. Emergence of *Klebsiella variicola* positive for NDM-9, a variant of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase, in an urban river in South Korea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 4, p. 1063–1067, 2017.

DOS SANTOS GONCALVES, M. et al. Anti-biofilm activity: A function of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

ELLERMAN, M.; ARTHUR, J. C. Siderophore-Mediated Iron Acquisition. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2018.

FAN, Z. et al. Glucose Induces Resistance to Polymyxins in High-Alcohol-Producing *Klebsiella pneumoniae* via Increasing Capsular Polysaccharide and Maintaining Intracellular ATP. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 4, p. 1–11, 2023.

FARZANA, R. et al. Outbreak of Hypervirulent Multidrug-resistant *Klebsiella variicola* Causing High Mortality in Neonates in Bangladesh. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 7, p. 1225–1227, 2019.

GARZA-RAMOS, U. et al. Draft Genome Sequence of the First Hypermucoviscous *Klebsiella variicola* Clinical Isolate. **Genome Announcements**, v. 3, n. 2, p. 3–4, 2015a.

GARZA-RAMOS, U. et al. Development of a Multiplex-PCR probe system for the proper identification of *Klebsiella variicola* Microbial genetics, genomics and proteomics. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2015b.

GARZA-RAMOS, U. et al. Identification and Characterization of Imipenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and Susceptible *Klebsiella variicola* Isolates Obtained from the Same Patient. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 3, p. 179–184, 2016.

GEKENIDIS, M. T. et al. Transferable extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (Esbl) plasmids in enterobacteriaceae from irrigation water. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 1–15, 2020.

GILL, S. K. et al. Increased airway glucose increases airway bacterial load in hyperglycaemia. **Scientific Reports**, v. 6, n. November 2015, p. 1–10, 2016.

GÖRKE, B.; STÜLKE, J. Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 613–624, 2008.

GUERRA, M. E. S. et al. *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Their Role in Disease Pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. May, p. 1–13, 2022.

HAWKEY, J. et al. A curated collection of *Klebsiella* metabolic models reveals variable substrate usage and gene essentiality. **Genome Research**, v. 32, n. 5, p. 1004–1014, 2022.

HOLDEN, V. I.; BACHMAN, M. A. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. **Metalomics**, v. 7, n. 6, p. 986–995, 2015.

HOLT, K. E. et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 27, p.E3574–E3581, 2015.

HOŠTACKÁ, A.; ČIŽNÁR, I.; ŠTEFKOVIČOVÁ, M. Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. **Folia Microbiologica**, v. 55, n. 1, p. 75–78, 2010.

HSIEH, P. F. et al. Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 12, p. 1717–1727, 2008.

HUANG, L. et al. Co-occurrence of *klebsiella variicola* and *klebsiella pneumoniae* both carrying *bla<sub>KPC</sub>* from a respiratory intensive care unit patient. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, n. October, p. 4503–4510, 2021.

HUDSON, A. W. et al. *Klebsiella pneumoniae* L-Fucose Metabolism Promotes Gastrointestinal Colonization and Modulates Its Virulence Determinants. **Infection and Immunity**, v. 90, n. 10, 2022.

HVKPIG, G. crossm Identification of Biomarkers for Differentiation of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Classical. v. 56, n. 9, 2018.

IREDELL, J.; BROWN, J.; TAGG, K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 352, p. h6420, 8 fev. 2016.

KILEY, J. L. et al. Resistance patterns and clinical outcomes of *Klebsiella pneumoniae* and invasive *Klebsiella variicola* in trauma patients. **PLoS ONE**, v. 16, n. 8 August, p. 1–12, 2021.

LEDEBOER, N. A. et al. Identification of gram-negative bacteria and genetic resistance determinants from positive blood culture broths by use of the verigene gram-negative blood

culture multiplex microarray-based molecular assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 8, p.2460–2472, 2015.

LEE, C. H. et al. Impact of glycemic control on capsular polysaccharide biosynthesis and opsonophagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*: Implications for invasive syndrome in patients with diabetes mellitus. **Virulence**, v. 7, n. 7, p. 770–778, 2016.

LEE, C.-R. et al. Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 483, 2017.

LEE, H. C. et al. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: Association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia. **Journal of Internal Medicine**, v. 259, n. 6, p. 606–614, 2006.

LI, Y.; NI, M. Regulation of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, n. September, p. 1–12, 2023.

LIN, C. T. et al. Fur regulation of the capsular polysaccharide biosynthesis and iron-acquisition systems in *Klebsiella pneumoniae* CG43. **Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 419–429, 2011.

LIN, C. T. et al. CRP-Cyclic AMP regulates the expression of type 3 fimbriae via cyclic di-GMP in *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–19, 2016.

LIN, J. C. et al. Impaired phagocytosis of capsular serotypes K1 or K2 *Klebsiella pneumoniae* in type 2 diabetes mellitus patients with poor glycemic control. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 8, p. 3084–3087, 2006.

LONG, S. W. et al. Whole-Genome Sequencing of Human Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates Reveals Misidentification and Misunderstandings of *Klebsiella*

*pneumoniae* , *Klebsiella variicola* , and *Klebsiella quasipneumoniae*. **mSphere**, v. 2, n. 4, p. e00290-17, 2017.

LU, Y. et al. Occurrence of colistin-resistant hypervirulent *Klebsiella variicola*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 11, p. 3001–3004, 2018.

MAATALLAH, M. et al. *Klebsiella variicola* is a frequent cause of bloodstream infection in the Stockholm area, and associated with higher mortality compared to *K. pneumoniae*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–21, 2014.

MEATHERALL, B. L. et al. Incidence, Risk Factors, and Outcomes of *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. **American Journal of Medicine**, v. 122, n. 9, p. 866–873, 2009.

MONDO, E. et al. First isolation of *Klebsiella variicola* from a horse pleural effusion. **BMC Veterinary Research**, v. 17, n. 1, p. 1–5, 2021.

MORALES-LEÓN, F. et al. Hypervirulent and hypermucoviscous extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola* in Chile. **Virulence**, v. 12, n. 1, p.35–44, 2021.

MUSELIUS, B. et al. Iron Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Defines New Roles for Lon Protease in Homeostasis and Degradation by Quantitative Proteomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. April, p. 1–16, 2020.

NAKAMURA-SILVA, R. et al. First report of hypermucoviscous *Klebsiella variicola* subsp. *variicola* causing primary endodontic infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 2, p. 303–304, 1 fev. 2021.

NORSIGIAN, C. J. et al. Comparative genome-scale metabolic modeling of metallo-beta-lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–9, 2019.

OHAMA, Y. et al. Accurate Identification of *Klebsiella variicola* by MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Microbiology Laboratories. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 5, 2022.

OPOKU-TEMENG, C. et al. Innate Host Defense against *Klebsiella pneumoniae* and the Outlook for Development of Immunotherapies. **Journal of Innate Immunity**, v. 14, n. 3, p. 167–181, 2022.

PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. [s.d.].

PAYNE, S. M. Detection, isolation, and characterization of siderophores. **Methods in Enzymology**, v. 235, n. C, p. 329–344, 1994.

POKORZYNSKI, N. D.; GROISMAN, E. A. How Bacterial Pathogens Coordinate Appetite with Virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 87, n. 3, p. 1–41, 2023.

POMAKOVA, D. K. et al. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: An emerging and under-recognized pathogenic variant. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 6, p. 981–989, 2012.

POTTER, R. F. et al. Population structure, antibiotic resistance, and uropathogenicity of *Klebsiella variicola*. **mBio**, v. 9, n. 6, 2018.

QUISPE, J. No Titleการบริหารจัดการการบริการที่มีคุณภาพใน  
โรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข. **วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสต์เซาเทิร์นเอเชีย**, v. 4,  
n. 1, p.88–100, 2023.

RAMIREZ, M. S. et al. Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-Negatives: the *Klebsiella pneumoniae* Paradigm . **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 5, p. 1–15, 2014.

RODRÍGUEZ-MEDINA, N. et al. Klebsiella variicola: an emerging pathogen in humans. **Emerging Microbes and Infections**, v. 8, n. 1, p. 973–988, 2019.

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

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. [s.l.: s.n.].

SEKI, M. et al. Fatal sepsis caused by an unusual Klebsiella species that was misidentified by an automated identification system. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART5, p. 801–803, 2013.

SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETIT, D.; D'ARI, R. Escherichia coli physiology in Luria-Bertanibroth. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8746–8749, 2007.

SHON, A. S.; BAJWA, R. P. S.; RUSSO, T. A. Hypervirulent (hypermucoviscous) Klebsiella Pneumoniae: A new and dangerous breed. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 107–118, 15 fev. 2013.

SRIVASTAVA, P. et al. Optimization and identification of siderophores produced by Pseudomonas monteilii strain MN759447 and its antagonism toward fungi associated with mortality in Dalbergia sissoo plantation forests. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 891–899, 2007.

STRUVE, C. et al. Mapping the Evolution of Hypervirulent Klebsiella pneumoniae. **mBio**, v.6, n. 4, p. e00630, 21 jul. 2015.

SURIANO, F. et al. Diet, microbiota, and the mucus layer: The guardians of our health. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. September, p. 1–14, 2022.

TZOUVELEKIS, L. S. et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: An evolving crisis of global dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n.4, p. 682–707, 2012.

WANDERSMAN, C.; DELEPELAIRE, P. Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, p. 611–647, 2004.

WANG, B. et al. Genetic Characteristics and Microbiological Profile of Hypermucoviscous Multidrug-Resistant *Klebsiella variicola* Coproducing IMP-4 and NDM-1 Carbapenemases. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 1, p. 1–7, 2022.

WANG, X. et al. Growth strategy of microbes on mixed carbon sources. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–7, 2019.

WU, H. et al. Bacteremia and other body site infection caused by hypervirulent and classic *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 254–262, 2017.

ZHENG, J. X. et al. Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of wcaG. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. FEB, 2018.

ZURFLUH, K. et al. First detection of *Klebsiella variicola* producing OXA-181 carbapenemase in fresh vegetable imported from Asia to Switzerland. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 4, n. 1, p. 1–3, 2015.