



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DIANA CAROLINA PARRA CHAVEZ

CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS DA MEMBRANA
EXTERNA (OMVs) PRODUZIDAS POR CEPAS DE *Klebsiella*
pneumoniae

CHARACTERIZATION OF OUTER MEMBRANE VESICLES
(OMVs) PRODUCED BY *Klebsiella pneumoniae* STRAINS

CAMPINAS

2022

DIANA CAROLINA PARRA CHAVEZ

**CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS DA MEMBRANA EXTERNA
(OMVs) PRODUZIDAS POR CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae***

**CHARACTERIZATION OF OUTER MEMBRANE VESICLES (OMVs)
PRODUCED BY *Klebsiella pneumoniae* STRAINS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestra em Genética e Biologia Molecular na área de Genética de Microorganismos.

Dissertation presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Genetics and Molecular Biology in the area of Genetics of Microorganisms.

Orientador: PROF. DR. MARCELO BROCCHI

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA DIANA CAROLINA PARRA
CHAVEZ E ORIENTADA PELO PROF. DR.
MARCELO BROCCHI.

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gustavo Lebre de Marco - CRB 8/7977

P247c Parra Chávez, Diana Carolina, 1983-
Caracterização de vesículas da membrana externa (OMVs) produzidas por
cepas de *Klebsiella pneumoniae* / Diana Carolina Parra Chávez. – Campinas,
SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Marcelo Brocchi.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Vesícula de membrana externa. 3.
Resistência. 4. Beta-Lactamas. I. Brocchi, Marcelo. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Characterization of outer membrane vesicles (OMVs) produced
by *Klebsiella pneumoniae* strains

Palavras-chave em inglês:

Klebsiella pneumoniae

Outer membrane vesicle

Resistance

Beta-Lactams

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Brocchi [Orientador]

Fausto Bruno dos Reis Almeida

Angelica Zaninelli Schreiber

Data de defesa: 20-12-2022

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0521-0800>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3915324587551026>

Campinas, 20 de dezembro de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Prof. Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida

Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia.

To God, for guiding every step of my life,

To my mom Isabel, for her unconditional support and love,

To my sister Camila, for her great love and complicity.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir cumprir um dos meus maiores sonhos e pela força e perseverança para morar em outro país longe da minha família e amigos. Além disso, por cada pessoa que ele colocou no meu caminho durante o desenvolvimento da minha pós-graduação.

A minha mãe, pelo apoio incondicional e seu grande amor. Graças a ela sou uma mulher forte, decidida e disciplinada. Ela é meu melhor exemplo como mulher e profissional. A minha irmã, pelo seu grande amor e cumplicidade. Ela é o melhor presente que Deus e meus pais me deram. Graças a Deus pela vida delas porque são meus mais grandes amores e porque apesar do tempo longe delas, elas foram meu suporte.

A meu orientador Prof. Dr. Marcelo Brocchi, por me receber em seu laboratório, por seus ensinamentos para ser uma melhor pessoa e profissional, por sua amizade e por ser quase um pai para mim.

A meus amigos Nedy, Marcela, Merly, Tavo e Mavy por me acompanhar de perto e de longe neste processo. Graças pelas visitas, mensagens, chamadas e por me ensinar que não tem fronteiras para as amizades verdadeiras. A Nedy, por sua ajuda incondicional, pela paciência quando não tinha ideia de falar português, por sua amizade e por me ensinar tantas coisas de Brasil.

A minha colega e amiga Yessica, por sua ajuda, por seus ensinamentos, por sua grande amizade e por essas conversas que não tinham fim. A minha colega Genesy por sua paciência, ensinamentos e amizade. Aos meus outros colegas do laboratório por seus ensinamentos e pelas horas de trabalho e conversas no laboratório.

A meus amigos Carlos, Alejandra e Fernando por todos os momentos compartilhados e pela amizade incondicional nas épocas boas e difíceis. Obrigada pelos passeios, conversas, risadas e brincadeiras. Vocês são um grande presente que ganhei no Brasil.

A minha família, por se preocupar por mim principalmente em tempos da pandemia quando eu tive que ficar meses isolada em Campinas.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade de aprender como fazer ciência em outro país. Aos professores do Programa de Pós-graduação, pelos ensinamentos e aprendizados durante meu mestrado.

Ao Prof. Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida por compartilhar seus conhecimentos sobre o maravilhoso mundo das OMVs e suas sugestões na minha banca de qualificação. À Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez Martinez e ao Prof. Dr. Marcelo Lancelloti, por cada uma das suas sugestões no projeto.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Unicamp, pela ajuda no processamento das amostras de OMVs. Ao Laboratório de Biomembranas do Instituto de Biologia da Unicamp pelo empréstimo de equipamentos para o isolamento das vesículas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Este estudo foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) – Código de Financiamento (309380/2019-7). Agradeço também à Agência de fomento à pesquisa Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por financiar indiretamente este trabalho.

Finalmente, a todas as pessoas que contribuíram ao desenvolvimento deste projeto.

RESUMO

Klebsiella pneumoniae é um importante patógeno para humanos, estando associado a diferentes tipos de infecções de difícil tratamento, uma vez que esta bactéria pode exibir o fenótipo de resistência múltipla a drogas (MDR), incluindo a resistência a antimicrobianos β -lactâmicos e carbapenêmicos. A produção de vesículas da membrana externa (OMVs) é uma característica exibida por diferentes organismos, incluindo bactérias patogênicas e a importância biológica da produção de OMVs por parte de organismos procariotos é crescente. A transmissão de resistência entre bactérias Gram-negativas pode ocorrer através de OMVs porque atuam como um sistema de secreção e liberação de genes de resistência a antibióticos, genes de virulência ou plasmídeos, permitindo a disseminação deles no ambiente e promovendo a interação com outras células sem contato celular. Considerando estas observações, o objetivo deste projeto foi caracterizar as OMVs produzidas por linhagens de *Klebsiella spp.* resistentes e suscetíveis a β -lactâmicos quanto sua estrutura e ao conteúdo de ácidos nucleicos, e avaliar seu potencial para transferir genes codificadores de carbapenemases a outras bactérias. Entre os dados obtidos, *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados e a expressão de carbapenemase confirmada. *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 mostrou resistência às cefalosporinas por expressar ESBL e *K. pneumoniae* ATCC 13883 apresentou suscetibilidade à maioria dos antimicrobianos, como esperado. Estes resultados foram confirmados por testes de perfil de resistência, testes fenotípicos para detecção de enzimas e PCR para detecção de genes de resistência. Além disso, a produção de OMVs pelas linhagens de *Klebsiella spp.* com diâmetros entre 30 nm e 500 nm, com predomínio de diâmetros menores que 200 nm, foi demonstrada durante o crescimento *in vitro* na fase estacionária atingindo concentrações desde $8,37 \times 10^{11}$ vesículas/ml a $1,36 \times 10^{12}$ vesículas/ml. Quanto à caracterização estrutural, as análises por NTA e TEM confirmaram a aparência esférica e de membrana dupla das OMVs. As análises por PCR demonstraram a presença do gene *bla_{SHV}* nas OMVs produzidas pelas três linhagens avaliadas de *Klebsiella spp.* e a presença do gene *bla_{NDM}* apenas em algumas OMVs de ATCC BAA-2146. Embora múltiplos experimentos de transferência de genes tenham sido realizados em diferentes condições, não foi possível obter transformantes.

Palavras chave: *Klebsiella pneumoniae*; vesículas de membrana externa; resistência; β -lactâmicos.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is an important pathogen for humans, frequently associated with different types of difficult-to-treat infections, since this bacterium usually exhibits a multidrug resistant phenotype (MDR), including resistance to β -lactams and carbapenem antimicrobials. The production of outer membrane vesicles (OMVs) is a characteristic exhibited by different organisms including pathogenic bacteria and the biological importance of OMVs secreted by prokaryotic organisms is increasing. The transmission of resistance between Gram-negative bacteria can occur through OMVs because they act as a secretion-delivery system for antibiotic resistance genes, virulence genes or plasmids, allowing their long-distance dissemination into the environment and promoting interaction with other cells without bacterial contact. Considering this information, the objective of this project is to characterize OMVs produced by *Klebsiella spp.* strains resistant and susceptible to β -lactams in terms of structure and nucleic-acid contents, and evaluate their potential to transfer genes encoding resistance markers to other bacteria. Among the data obtained, *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 showed resistance to all tested antimicrobials and confirmed carbapenemase expression, *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 showed resistance to cephalosporins (ESBL phenotype) and *K. pneumoniae* ATCC 13883 showed susceptibility to most of the antimicrobials as expected. These results were confirmed by resistance profile tests, phenotypic tests for enzyme detection and PCR for resistance gene detection. In addition, the production of OMVs by *Klebsiella spp.* strains with diameters between 30 nm and 500 nm with a predominance of diameters smaller than 200 nm, was demonstrated during *in vitro* growth in the stationary phase, reaching concentrations from $8,37 \times 10^{11}$ vesicles/ml to $1,36 \times 10^{12}$ vesicles/ml. Structural characterization by NTA and TEM analyzes confirmed the spherical and double membrane appearance of the OMVs. PCR analyzes showed the presence of *bla_{SHV}* gene in the OMVs produced by the three strains evaluated of *Klebsiella spp.* and the presence of *bla_{NDM}* gene only in some OMVs of ATCC BAA-2146. Although multiple gene transfer experiments were performed under different conditions, it was not possible to obtain transformants.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; outer membrane vesicles; resistance; β -lactams.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Curvas de crescimento das linhagens de *K. pneumoniae* (ATCC BAA-2146, ATCC 13883), *K. quasipneumoniae* (ATCC 700603) e de *E. coli* (JM109). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados apresentados são representativos dos 3 experimentos.....31
- Figura 2.** Placas de Petri com meio Mueller-Hinton inoculadas com culturas das linhagens de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 (A), *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 (B), *K. pneumoniae* ATCC 13883 (C) e *E. coli* JM109 (D) para determinação dos perfis de resistência a antimicrobianos pelo Método de disco-difusão.....34
- Figura 3.** Placas de Petri com meio Mueller-Hinton inoculadas com as linhagens *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 (A), *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 (B), *K. pneumoniae* ATCC 13883 (C) e *E. coli* JM109 (D) para o teste fenotípico de produção de beta-lactamases de espectro estendido. Em destaque no painel A a zona característica formada pelo efeito sinérgico dos antimicrobianos. Notar que a linhagem ATCC BAA-2146 foi resistente, enquanto que as linhagens ATCC 13883 e *E. coli* JM109 foram suscetíveis.....35
- Figura 4.** Placas de Petri com meio Mueller-Hinton inoculadas com amostras das linhagens de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 (A), *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 (B) e *K. pneumoniae* ATCC 13883 (C) para o teste fenotípico de produção de carbapenemases. Em destaque (painel A) os halos de inibição maiores formados ao redor dos discos de Imipenem e Meropenem quando adicionado o inibidor EDTA, indicando produção de metallo-beta-lactamase (MBL).37
- Figura 5.** Gel de agarose 1% demonstrando o perfil de amplificação dos genes de resistência *bla_{NDM}* e *bla_{SHV}* nas linhagens de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146, *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 e *K. pneumoniae* ATCC 13883. 1. Marcador molecular 1kb Ladder, Ready-To-Use (Sinapse, inc.); 2. Detecção do gene *bla_{NDM}* na linhagem ATCC BAA-2146; 3. Detecção do gene *bla_{SHV}* na linhagem ATCC BAA-2146; 4. Ausência do gene *bla_{NDM}* na linhagem ATCC 700603, 5. Detecção do gene *bla_{SHV}* na linhagem ATCC 700603; 6. Ausência do gene *bla_{NDM}* na linhagem ATCC 13883; 7. Detecção do gene *bla_{SHV}* na linhagem ATCC 13883; 8. Controle negativo (mix de PCR com primers para NDM e sem bactéria); 9. Controle negativo (mix de PCR com primers para SHV e sem bactéria).38

Figura 6. Gel de agarose 0,7% demonstrando a amplificação dos genes de resistência bla_{NDM} e bla_{SHV} nos plasmídeos extraídos das linhagens de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146, *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 e *K. pneumoniae* ATCC 13883. 1. Marcador molecular 1kb Ladder, Ready-To-Use (Sinapse, inc.); 2. Detecção do gene bla_{NDM} no DNA plasmidial da linhagem ATCC BAA-2146; 3. Detecção do gene bla_{SHV} no DNA plasmidial da linhagem ATCC BAA-2146; 4. Ausência do gene bla_{NDM} no DNA plasmidial da linhagem ATCC 700603, 5. Detecção do gene bla_{SHV} no DNA plasmidial da linhagem ATCC 700603; 6. Ausência do gene bla_{NDM} no DNA plasmidial da linhagem ATCC 13883; 7. Detecção do gene bla_{SHV} no DNA plasmidial da linhagem ATCC 13883; 8. Controle negativo (mix de PCR com primers para NDM e sem DNA plasmidial); 9. Controle negativo (mix de PCR com primers para SHV e sem DNA plasmidial).39

Figura 7. Vesículas da membrana externa (OMVs) isoladas das linhagens de *Klebsiella spp.* OMVs de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 (A), OMVs de *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 (B), OMVs de *K. pneumoniae* ATCC 13883 (C). As vesículas se observam como partículas brancas e brilhantes.....40

Figura 8. Concentração e diâmetro médio das OMVs isoladas das linhagens de *Klebsiella spp.* Os picos mais altos dos gráficos indicam o diâmetro mais frequente das vesículas. OMVs de ATCC BAA-2146 com diâmetro mais frequente de 115,2 nm (A), OMVs de ATCC 700603 com diâmetro mais frequente de 95,7 nm (B) e OMVs de ATCC 13883 com diâmetro mais frequente de 100,0 nm (C).....42

Figura 9. Quantificação de proteínas pelo Método de Bradford usando diferentes concentrações da proteína padrão BSA (poços 2-7) e soluções das OMVs das linhagens de *Klebsiella spp.* (poços 8-10). 1. Branco (água); 2. BSA 0,06 mg / ml; 3. BSA 0,125 mg / ml; 4. BSA 0,25 mg / ml; 5. BSA 0,5 mg / ml; 6. BSA 1 mg / ml; 7. BSA 2 mg / ml; 8. OMVs de ATCC BAA-2146; 9. OMVs de ATCC 700603; 10. OMVs de ATCC 13883.....43

Figura 10. Curva padrão da proteína BSA que mostra a relação entre a absorbância e a concentração de proteína. Com os dados das absorbâncias das amostras de OMVs, foram obtidas as concentrações de proteínas.....44

Figura 11. Gel de agarose 1% demonstrando o perfil de amplificação dos genes de resistência bla_{NDM} e bla_{SHV} nas OMVs produzidas pelas linhagens de *K. pneumoniae* e *K. quasipneumoniae*, sem tratamento com DNase I. 1. Marcador molecular 1kb Ladder, Ready-To-Use (Sinapse, inc.); 2. Detecção do gene bla_{NDM} nas OMVs de

ATCC BAA-2146; 3. Detecção do gene bla_{SHV} nas OMVs de ATCC 700603; 4. Ausência do gene bla_{NDM} nas OMVs de ATCC 13883; 5. Detecção do gene bla_{SHV} nas OMVs de ATCC 13883; 6. Detecção do gene bla_{SHV} nas OMVs de ATCC BAA-2146; 7. Ausência do gene bla_{NDM} nas OMVs de ATCC 700603; 8. Controle negativo (mix de PCR com primers para NDM e sem OMVs); 9. Controle negativo (mix de PCR com primers para SHV e sem OMVs).....45

Figura 12. Gel de agarose 1% demonstrando o perfil de amplificação dos genes de resistência bla_{NDM} e bla_{SHV} nas OMVs produzidas pelas linhagens de *K. pneumoniae* e *K. quasipneumoniae*. As OMVs foram tratadas com DNase I e Triton X-100. 1. Marcador molecular 1kb Ladder, Ready-To-Use (Sinapse, inc.); 2. Ausência do gene bla_{NDM} nas OMVs de ATCC BAA-2146; 3. Detecção do gene bla_{SHV} nas OMVs de ATCC BAA-2146; 4. Ausência do gene bla_{NDM} nas OMVs de ATCC 700603; 5. Detecção do gene bla_{SHV} nas OMVs de ATCC 700603; 6. Ausência do gene bla_{NDM} nas OMVs de ATCC 13883; 7. Detecção do gene bla_{SHV} nas OMVs de ATCC 13883; 8. Controle negativo (mix de PCR com primers para NDM e sem OMVs); 9. Controle negativo (mix de PCR com primers para SHV e sem OMVs); 10. Controle positivo (gene bla_{NDM} na linhagem ATCC BAA-2146); 11. Controle positivo (gene bla_{SHV} na linhagem ATCC BAA-2146); 12. Controle positivo (gene bla_{SHV} na linhagem ATCC 700603); 13. Controle positivo (gene bla_{SHV} na linhagem ATCC 13883).....46

Figura 13. Microscopia eletrônica de transmissão de OMVs produzidas por *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 (A), *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 (B) e *K. pneumoniae* ATCC 13883 (C). OMVs foram isoladas de culturas *in vitro* em fase estacionária por ultrafiltração e ultracentrifugação. Nos painéis B e C as setas indicam vesículas esféricas com aparência de membrana dupla.49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados neste estudo para a detecção de genes de resistência.	27
Tabela 2. Perfil de Resistencia a Antimicrobianos das linhagens avaliadas de <i>Klebsiella spp</i> e <i>E. coli</i> , realizado pelo Método de disco-difusão conforme o CLSI (2020).	32
Tabela 3. Absorbância e concentração de proteínas das amostras de OMVs produzidas pelas linhagens de <i>Klebsiella spp</i> , de acordo à curva padrão da BSA. ..	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AFB	Ácido fenilborônico
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Graus Celsius
CLOXA	Cloxacilina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DDST	Double disk synergy test
DNA	Deoxyribonucleic acid
DO	Densidade óptica
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESBL	Extended spectrum Beta-lactamase
g	Força da gravidade
IACG	Interagency Coordination Group
IACS	Infecções associadas aos cuidados de saúde
kDa	kiloDalton
KPC	Klebsiella pneumoniae carbapenemase
LB	Luria Bertani medium
Lpp	Lipoproteína de Braun
MBL	Metallo-beta-lactamase
MDR	Multidrug-resistant
miRNA	Micro RNA
ml	mililitro

mm	milímetro
NDM-1	New Delhi metallo-beta-lactamase-1
nm	nanômetro
NTA	Nanoparticle tracking analysis
OMS	Organização Mundial da Saúde
Omp	Outer membrane protein
OMV	Outer membrane vesicles
PCR	Polymerase chain reaction
PQS	Pseudomonas quinolone signal
RNA	Ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
SHV-18	Sulfhydryl variable-18 enzyme
SOC	Super optimal broth with catabolite repression medium
TEM	Transmission electron microscopy
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
µg	microgramas
µl	microlitros
µm	micrômetros
WGS	Whole-genome sequencing

SUMÁRIO

1. Introdução	19
2. Objetivos e justificativa.....	23
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
2.3. Justificativas	24
3. Materiais e Métodos	25
3.1. Linhagens bacterianas e condições de crescimento	25
3.2. Caracterização das cepas de <i>K. pneumoniae</i> e <i>K. quasipneumoniae</i>	25
3.2.1. Curvas de crescimento <i>in vitro</i>	25
3.2.2. Perfil de Resistência a Antimicrobianos	25
3.2.3. Teste fenotípico para Detecção de ESBL.....	26
3.2.4. Teste fenotípico para Detecção de Carbapenemases	26
3.2.5. Detecção de genes de resistência por PCR.....	27
3.3. Isolamento e purificação de OMVs.....	27
3.4. Caracterização de OMVs por Microscopia Eletrônica	29
3.5. Transferência de carbapenemase e ESBL de OMVs para cepas bacterianas de laboratório	29
4. Resultados e Discussão.....	31
4.1. Caracterização das cepas de <i>K. pneumoniae</i> e <i>K. quasipneumoniae</i>	31
4.1.1. Curvas de crescimento <i>in vitro</i>	31
4.1.2. Perfil de Resistência a Antimicrobianos	31
4.1.3. Teste fenotípico para Detecção de ESBL.....	34
4.1.4. Teste fenotípico para Detecção de Carbapenemases	36
4.1.5. Detecção de genes de resistência por PCR	38
4.2. Isolamento e Purificação de OMVs.....	40
4.2.1. Quantificação e cálculo do diâmetro das OMVs.....	40
4.2.2. Quantificação do conteúdo de proteínas das OMVs	43
4.2.3. Detecção de genes de resistência nas OMVs.....	44
4.3. Caracterização de OMVs por Microscopia Eletrônica.....	47
4.4. Transferência de carbapenemase e ESBLs de OMVs para as cepas bacterianas de laboratório	49
5. Conclusões	51
6. Perspectivas futuras.....	53
7. Referências	54

Anexo 1.....	65
Anexo 2.....	66

1. Introdução

As infecções associadas aos cuidados de saúde (IACS) ou infecções nosocomiais são um dos eventos mais comuns na prestação de cuidados médicos e/ou cirúrgicos e representam um grande problema de saúde pública com impacto na morbidade, mortalidade e qualidade de vida. Essas infecções ocorrem em pacientes durante atendimento hospitalar ou outro centro de saúde, não estando presentes no momento da admissão. Em 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou que até 7% dos pacientes nos países desenvolvidos e 10% nos países em desenvolvimento adquiriram pelo menos uma IACS. Os tipos mais frequentes de IACS incluem infecções da corrente sanguínea, infecções do trato urinário associadas a cateter, infecções de ferida cirúrgica e do trato respiratório associadas a ventilação mecânica (Khan et al., 2017; WHO, 2016). No entanto, essas IACS não aparecem na lista das 100 principais doenças mundiais publicadas pela OMS porque seu diagnóstico é complexo e se baseia em múltiplos critérios. O impacto dessas infecções pode resultar em incapacidade a longo prazo, internação hospitalar prolongada, aumento da resistência de microrganismos a agentes antimicrobianos, altos custos para os pacientes e excesso de mortes (Hendrik et al., 2015; WHO, 2011).

Dentre os principais patógenos responsáveis por infecções nosocomiais, encontram-se bactérias, vírus e fungos, cuja incidência pode variar dependendo do ambiente das instalações médicas e dos diferentes grupos de pacientes. As bactérias são os patógenos mais comuns, algumas delas pertencem à microbiota natural do paciente, mas podem causar infecção em pessoas imunodebilitadas ou imunodeprimidas (Khan et al., 2017).

O aumento global das bactérias multirresistentes (MDR) representa uma ameaça à saúde humana (Granata e Petrosillo, 2017). Os principais patógenos responsáveis pela crise de resistência antimicrobiana e da maioria das IACS, estão no grupo ESKAPE (Gram positivos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*; e Gram negativos: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*). Os patógenos gram-negativos deste grupo são considerados o maior problema, devido ao surgimento de cepas resistentes a todos ou à maioria dos antibióticos disponíveis (Wyres e Holt, 2018; Haque et al., 2018; Ramirez et al., 2014).

Em relatório para a OMS intitulado *No Time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections*, a *Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance* (IACG) faz um alerta sobre a necessidade de se intervir imediatamente no controle de bactérias multirresistentes. Em trecho extraído deste relatório, a IACG faz um prognóstico alarmante sobre essas infecções: “*Drug-resistant diseases already cause at least 700,000 deaths globally a year, including 230,000 deaths from multidrug-resistant tuberculosis, a figure that could increase to 10 million deaths globally per year by 2050 under the most alarming scenario if no action is taken. Around 2.4 million people could die in high-income countries between 2015 and 2050 without a sustained effort to contain antimicrobial resistance.*” (<https://www.who.int/news-room/detail/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>). Além disso, uma análise sistemática recente sobre a carga global da resistência antimicrobiana bacteriana estimou que 4,95 milhões de mortes foram atribuídas à MDR bacteriana globalmente no 2019 com seis principais patógenos identificados como prioritários pela OMS que representam uma ameaça à saúde e por tanto merecem mais atenção, capacitação e pesquisa. ([https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)02724-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)02724-0/fulltext)).

K. pneumoniae tem sido reconhecida como a bactéria gram-negativa multirresistente mais frequente que causa infecções nosocomiais como pneumonia, meningite, infecção do trato urinário, infecções de feridas cirúrgicas, bacteremia e abscessos hepáticos (Effah et al., 2020; Lee et al., 2017; Navon-Venezia et al., 2017; Paczosa e Mecsas, 2016). Estudos filogenéticos de isolados classicamente identificados como *K. pneumoniae*, demonstraram a existência de três principais filogrupos denominados KpI, KpII e KpIII, conforme análises de sequência dos genes *gyrA* e *parC* (Brisse e Verhoef, 2001; Brisse et al., 2004). Trabalhos taxonômicos subsequentes propuseram os nomes *Klebsiella pneumoniae* para o filogrupo KpI, *Klebsiella quasipneumoniae* para o filogrupo KpII e *Klebsiella variicola* para o filogrupo KpIII. No entanto, o filogrupo KpII foi subdividido nos subgrupos KpII-A e KpII-B correspondendo às subespécies, *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* e *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, respectivamente (Elliott et al., 2016; Maatallah et al., 2014, Brisse et al., 2014). Estudos recentes de sequenciamento do genoma completo (WGS) demonstraram que uma grande proporção de isolados

identificados como *K. pneumoniae* na verdade pertence a espécies intimamente relacionadas que compartilham 95 – 96% de identidade de nucleotídeos e que constituem o complexo de espécies de *K. pneumoniae* (Wyres et al., 2020; Rodrigues et al., 2018; Long et al., 2017). Recentemente, a linhagem ATCC 700603 originalmente classificada como *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* conhecida como K6, foi reclassificada como *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* e análises de WGS confirmaram a presença do gene de resistência bla_{OKP-B} no cromossomo, um gene específico dessa subespécie (Elliott et al., 2016).

Bactérias pertencentes ao complexo *K. pneumoniae* são os mais representativos do gênero *Klebsiella* e os mais comumente relatados entre os gêneros de Enterobacteriaceae, resistentes às principais classes de antibióticos, devido a sua capacidade de produzir Beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e Carbapenemases, que hidrolisam antibióticos como cefalosporinas, monobactâmicos, penicilinas e carbapenêmicos (Navon-Venezia et al., 2017; Paczosa e Mecsas, 2016; Doorduyn et al., 2016; Ramirez et al., 2014). Essa resistência pode estar associada a genes codificados por plasmídeos ou elementos genéticos móveis que podem permitir a disseminação de genes de resistência e virulência de uma bactéria para outra (Effah et al., 2020; Gomez e Uhlemann, 2017).

A transmissão da resistência entre bactérias gram-negativas também pode ocorrer através de vesículas da membrana externa (OMVs) porque elas atuam como um sistema de secreção e liberação de genes de resistência a antibióticos, genes de virulência ou plasmídeos, permitindo a disseminação de longa distância deles no ambiente e promovendo a interação com outras células sem contato celular (Chatterjee et al., 2017; Rumbo et al., 2011; Yaron et al., 2000).

Existem diferentes tipos de vesículas extracelulares produzidas por células eucarióticas como microvesículas, corpos apoptóticos e exossomos. Estudos relatam que os exossomos podem participar da comunicação intercelular, em processos fisiológicos e em processos patológicos como o câncer, devido à transferência de moléculas para células receptoras que promovem o crescimento tumoral (Thakur et al., 2022). Em relação às vesículas produzidas por células procarióticas, as mais conhecidas são as vesículas da membrana externa que são estruturas pequenas, esféricas e de bicamadas lipídicas liberadas da membrana externa de bactérias gram-

negativas durante todas as fases de seu crescimento (Jan, 2017; Anand e Chaudhuri, 2016; Cahill et al., 2015). Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar sua biogênese. Alguns deles propõem que uma diminuição das proteínas de ligação cruzada entre a membrana externa e o peptidoglicano como a Lipoproteína de Braun (Lpp) e a proteína de membrana externa (OmpA), induz a curvatura da membrana externa e seguidamente a formação das vesículas. Além disso, o acúmulo de proteínas mal dobradas, lipopolissacarídeos e fragmentos de peptidoglicano em regiões do espaço periplásmico conhecidas como nanoterritórios promovem a produção de vesículas. Estudos têm relatado que a perda de algumas proteínas do sistema Tol-Pal como TolA, TolR e TolQ afeta a integridade da membrana promovendo seu abaulamento e a formação de vesículas. O processo de vesiculação pode também ser induzido pela intercalação de moléculas na membrana externa que aumentam a curvatura dela como ocorre com a molécula de sinalização PQS em *Pseudomonas aeruginosa* (Nagakubo et al., 2020; Toyofuku et al., 2019; Anand e Chaudhuri, 2017; Jan, 2017; Schwechheimer e Kuehn, 2015). Embora diferentes modelos têm sido propostos para explicar a formação das vesículas de membrana externa, Roier et al. (2016) propôs um mecanismo geral e conservado para a biogênese das OMVs nas bactérias Gram negativas, baseado no sistema de transporte ABC VacJ/Yrb. Segundo este mecanismo, a deleção ou baixa expressão dos genes *vacJ* e *yrb* induz o acúmulo de fosfolipídios na membrana externa com uma distribuição assimétrica, promovendo o abaulamento da membrana para formar as vesículas.

As OMVs estão envolvidas em diversas funções como liberação de toxinas e fatores de virulência, comunicação intercelular bacteriana, formação de biofilme, resistência a antibióticos e modulação das respostas imunes do hospedeiro (Martora et al., 2019; Gill et al., 2018; Anand e Chaudhuri, 2016; Rumbo et al., 2011). Essas funções são conferidas pelo diferente conteúdo das vesículas como ácidos nucleicos (DNA, RNA), toxinas, fosfolipídios, lipopolissacarídeos, componentes da parede celular, proteínas (da membrana externa, periplasmáticas, citoplasmáticas e ligadas à membrana), metabolitos de íons e moléculas de sinalização (Jan, 2017; Bitto e Kaparakis-Liaskos, 2017; Ellis e Kuehn, 2010).

Algumas espécies têm sido relatadas como produtoras de OMVs como *Escherichia coli*, *Borrelia burgdorferi*, *Neisseria* spp., *Bacteroides* spp., *Shigella* spp.,

Helicobacter pylori, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio* spp. e *Acinetobacter baumannii*, entre outras (Tiwari et al., 2017; Jan, 2017; Chatterjee et al., 2017; Rumbo et al., 2011).

Estudos sobre as vesículas de membrana externa em *K. pneumoniae* são poucos e se concentram em demonstrar que podem contribuir para a patogênese da infecção do hospedeiro por meio de alterações na expressão de miRNA nas células epiteliais brônquicas humanas, provocam uma resposta inflamatória potente (Martora et al., 2019), aumentam a expressão de genes relacionados à imunidade nos epitélios e mastócitos (You et al., 2019), contêm proteínas envolvidas na eliminação de toxinas e fagos, no transporte intercelular de proteínas e material genético e na modulação das defensas do hospedeiro (You et al., 2018), protegem contra a letalidade induzida por infecção (Lee et al., 2015) e induzem a resposta imune inata *in vitro* e patologia pulmonar *in vivo* pela expressão de citocinas pró-inflamatórias (Lee et al., 2012). Assim, o objetivo deste projeto é caracterizar as OMVs produzidas por *K. pneumoniae* resistentes e suscetíveis aos β -lactâmicos e avaliar sua capacidade como veículos para transferir genes de resistência a outras bactérias.

2. Objetivos e justificativa

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo é caracterizar as vesículas de membrana externa (OMVs) produzidas por linhagens de *K. pneumoniae* quanto sua estrutura e o conteúdo de DNA.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar as linhagens de *K. pneumoniae* quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos pelo método de disco-difusão e por métodos fenotípicos, confirmando estes perfis.
- Isolar, purificar e quantificar as vesículas de membrana externa produzidas pelas linhagens de *K. pneumoniae*.
- Caracterizar estruturalmente, por Microscopia Eletrônica, as vesículas de membrana externa isoladas e purificadas de *K. pneumoniae*.

- Caracterizar o conteúdo de DNA das vesículas de membrana externa obtidas das linhagens de *K. pneumoniae*.
- Verificar o potencial de transferência de genes de resistência a β -lactâmicos para linhagens sensíveis, utilizando as vesículas de membrana externa produzidas por *K. pneumoniae*.

2.3. Justificativas

A caracterização de vesículas de membrana externa (OMVs) de *K. pneumoniae* certamente revelará aspectos importantes da biologia dessa bactéria, incluindo os papéis de OMVs na patogenicidade e resistência antimicrobiana. A caracterização de conteúdo de DNA dessas vesículas poderá trazer à luz novos mecanismos de patogenicidade e estratégias empregadas pela bactéria para disseminar moléculas sinalizadoras/efetoras e genes de resistência.

3. Materiais e Métodos

3.1. Linhagens bacterianas e condições de crescimento

Três linhagens de *K. pneumoniae* do American Type Culture Collection (ATCC) foram usadas em todos os experimentos. *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 700603, que foi recentemente reclassificada como *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (Elliott et al., 2016), é uma linhagem controle para a produção de β -lactamase de espectro estendido, SHV-18. *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 é uma linhagem positiva de New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) (bla_{NDM} positivo por PCR), resistente aos carbapenêmicos (Imipenem, Meropenem e Ertapenem). *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 13883 é uma linhagem suscetível aos carbapenêmicos (Findlay et al., 2012) e, portanto, foi usada como cepa controle. A linhagem JM109 de *Escherichia coli* foi utilizada como controle em alguns experimentos.

As linhagens bacterianas foram cultivadas em meio Caldo Luria Bertani (LB) e LB Ágar (Sambrook e Russell, 2001) com 25 μg / ml de Imipenem quando necessário. Estoques bacterianos foram preparados em meio LB com 30% de glicerol e conservados a -80°C .

3.2. Caracterização das cepas de *K. pneumoniae* e *K. quasipneumoniae*

3.2.1. Curvas de crescimento *in vitro*

Para as linhagens de *Klebsiella spp* e *E. coli* JM109, curvas de crescimento foram avaliadas a partir de culturas em 50 ml de meio LB preparadas (diluição 1:1000) de pré-inóculos crescidos por 16-18 horas. O crescimento a 37°C sob agitação (150 rpm) foi acompanhado ao longo de 24 horas através da leitura da densidade óptica (DO) em intervalos de 2 horas e pela determinação das UFC (Unidades Formadoras de Colônias) por contagens em meio LB Ágar.

3.2.2. Perfil de Resistência a Antimicrobianos

Todas as linhagens de *Klebsiella spp* foram caracterizadas quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos para confirmar os fenótipos resistentes, pelo Método de disco-difusão seguindo os protocolos do CLSI M100 (2020) e CLSI M02-A12 (2015). Este ensaio foi realizado em meio Mueller-Hinton Ágar (Oxoid) com os antimicrobianos: amoxicilina (10 μg), cefoxitina (30 μg), cefotaxima (30 μg), ceftazidima (30 μg), meropenem (10 μg), ertapenem (10 μg), imipenem (10 μg),

enrofloxacin (5 µg), ciprofloxacin (5 µg), tetracycline (30 µg), streptomycin (10 µg), gentamicin (10 µg), amikacin (30 µg) and sulfamethoxazole / trimethoprim (25 µg). After 16-18 hours of incubation at 37°C, the diameter of the inhibition halos for each antimicrobial was measured. As control was used the lineage of *Escherichia coli* JM109, sensitive to the majority of the antibiotics tested.

3.2.3. Teste fenotípico para Detecção de ESBL

The production of ESBL was evaluated by the Test of Synergy of Double Disc (DDST) with amoxicillin / clavulanic acid (20 µg / 10 µg), ceftazidime (30 µg) and cefotaxime (30 µg) (Oxoid) maintaining a distance of 20 mm between the discs. The test was considered positive when there was the formation of a zone known as “champagne” or “buraco da fechadura”, by the extension of the edge of the inhibition zone of the cephalosporin tested in direction to the disc containing clavulanic acid (Jarlier et al., 1988; Drieux et al., 2008).

3.2.4. Teste fenotípico para Detecção de Carbapenemases

The production of carbapenemases was evaluated according to the Technical Note of ANVISA No. 01/ 2013. To perform the test were used discs of imipenem and meropenem without inhibitors and discs with the inhibitors EDTA 0.1 M, Acetic acid (AFB) 40 mg / ml and Cloxacillin (CLOXA) 75 mg / ml. To prepare the discs with the enzymatic inhibitors, 10 µl of the solution of EDTA, AFB and CLOXA were placed separately on the discs of imipenem and meropenem. After evaporation of the excess of moisture, the discs were placed on petri plates and were incubated for 18 hours at 37°C. The results were interpreted according to the Technical Note of ANVISA No. 01/ 2013, where isolates with difference of diameter ≥ 5 mm for the discs with EDTA in relation to the discs without the inhibitor, were considered potential producers of metallo-beta-lactamases. In addition, isolates with difference of diameter ≥ 5 mm for the discs with AFB were considered possible producers of KPC and isolates with difference of diameter ≥ 5 mm for the discs with AFB and CLOXA were considered producers of AmpC plasmidial and deficient in porins. The isolates with difference of diameter of inhibition halo < 5 mm with AFB, CLOXA and EDTA, can be mutants deficient in porins or producers of OXA-48.

3.2.5. Detecção de genes de resistência por PCR

A detecção por PCR dos genes de resistência bla_{NDM} e bla_{SHV} nas linhagens de *Klebsiella spp.* foi realizada conforme descrito anteriormente (Maina et al., 2017; Nordmann et al., 2011; Poirel et al., 2011; Sabaté et al., 2002), usando os pares de *primers* específicos descritos na Tabela 1. Para visualizar os genes, eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada conforme descrito por Sambrook e Russell (2001).

A extração de plasmídeos das linhagens de *Klebsiella spp.* foi realizada utilizando o kit de extração de plasmídeos QIAprep® Spin Miniprep Kit de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (QIAGEN, Hilden, Germany) para recuperar plasmídeos grandes de baixo número de cópias. Após fazer a quantificação do DNA plasmidial no Nanodrop NP80 (Implen), uma PCR foi realizada seguindo Sambrook e Russell (2001) e os resultados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (0,7%).

Tabela 1. Primers utilizados neste estudo para a detecção de genes de resistência.

Nome do Primer	Sequência (5' – 3')	bps	Referência
NDM-f	GGTTTGCGCATCTGGTTTTC	621	Maina et. al., 2017.
NDM-r	CGGAATGGCTCATCACGATC		Nordmann et al., 2011. Poirel et al., 2011.
SHV-f	CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC	1016	Maina et. al., 2017.
SHV-r	TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA		Sabaté et. al., 2002.

3.3. Isolamento e purificação de OMVs

A produção e purificação de OMVs foram realizadas conforme descrito por Chutkan et al. (2013). Resumidamente, as cepas bacterianas foram cultivadas em 100 ml de meio LB, inoculado com 200-300 µl de uma cultura noturna. As OMVs foram coletadas a partir de culturas em fase estacionária, após 20 horas de incubação a 37°C e a 150 rpm. Após o crescimento, as células foram precipitadas por centrifugação

(6.000 rpm, 4°C, 1 hora e 30 minutos) e o sobrenadante da cultura foi filtrado em membranas de 0,22 µm usando um sistema de filtração a vácuo (Millipore). Em seguida, o sobrenadante foi concentrado por ultrafiltração em filtros Amicon (Merck) com membrana para diálise de 100 kDa (Millipore), submetido a filtração com filtros de 0,22 µm e ultracentrifugação (60.000 rpm, 4°C, 1 hora e 30 minutos), usando uma ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90K com rotor 90Ti. O sedimento foi suspenso em 500 µl de PBS 1X (Sambrook e Russell, 2001). As OMVs foram quantificadas e o diâmetro médio foi calculado por análises em NanoSight NS300 (Malvern). As soluções de OMVs foram verificadas quanto à esterilidade em placas de Petri com meio LB Ágar e armazenadas a -80°C até o uso. Este experimento foi realizado nas Instalações da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com a orientação do Prof. Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida e nas Instalações do Laboratório de Biomembranas do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

A concentração proteica nas OMVs purificadas foi estimada pelo teste de Bradford (Bradford, 1976) utilizando soluções com diferentes concentrações da proteína BSA como padrão e soluções das OMVs isoladas e purificadas das linhagens de *Klebsiella spp.*

A detecção dos genes de resistência *bla_{NDM}* e *bla_{SHV}* nas OMVs produzidas pelas linhagens de *Klebsiella spp* foi realizada por PCR usando os *primers* específicos da Tabela 1. As soluções de OMVs foram previamente submetidas ao tratamento descrito por Bhar et al. (2021), Chatterjee et al. (2017), Rumbo et al. (2011) e Yaron et al. (2000). As amostras de OMVs foram tratadas com 2 U de DNase I (Thermo Scientific) por 30 minutos a 37°C para hidrolisar o DNA associado à superfície das vesículas e o DNA livre na suspensão. A DNase foi desnaturada por tratamento térmico durante 10 minutos a 65°C. As OMVs tratadas, foram lisadas com solução de Triton X-100 0,125% por 30 minutos a 37°C e purificadas com o kit de limpeza Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, de acordo com as instruções do fabricante (Promega). Em seguida, o DNA das OMVs foi quantificado no Nanodrop NP80 (Implen), utilizado para realizar PCR e visualizado em uma eletroforese em gel de agarose 1%. Amostras de OMVs sem tratamento com DNase foram também utilizadas para realizar a detecção dos genes de resistência por PCR.

3.4. Caracterização de OMVs por Microscopia Eletrônica

Esta análise foi realizada conforme descrito anteriormente (Martora et al., 2019; You et al., 2018; Chatterjee et al., 2017; Yaron et al., 2000). Das suspensões de OMVs, 20 µl foram transferidos para redes de cobre revestidas com formvar e carbono (300 mesh) e tratadas com 100 µl de Acetato de Uranila 2% por 3 minutos. As amostras foram analisadas e fotografadas com o microscópio eletrônico de transmissão LEO 906, Carl Zeiss operado com uma tensão de 60 kV, câmera CCD Morada e software de captura de imagens iTEM. Este experimento foi realizado nas Instalações de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

3.5. Transferência de carbapenamase e ESBL de OMVs para cepas bacterianas de laboratório

A transferência dos genes codificadores de carbapenamase (*bla_{NDM-1}*) e ESBL (*bla_{SHV-18}*) das OMVs para *E. coli* JM109 e *K. pneumoniae* ATCC 13883 foi realizada conforme descrito na literatura, usando protocolo adaptado de outras espécies bacterianas (Chatterjee et al., 2017; Rumbo et al., 2011; Yaron et al., 2000). As cepas JM109 e ATCC 13883 foram cultivadas em 3 ml de meio LB até a densidade óptica de 0,6 (λ 600 nm). As células foram submetidas a centrifugação (10.000 x g, 5 minutos) e ressuspensas em 1 ml de meio LB previamente gelado a uma concentração de 10^7 ufc / ml. As suspensões celulares (60 µl) foram misturadas com diferentes quantidades de OMVs purificadas (contendo 1, 5, 10 e 20 µg de proteína) obtidas de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146. Essas suspensões foram incubadas por 4 horas a 37°C e depois por mais 4 horas a 37°C com agitação (150 rpm). A cada suspensão foram então adicionados 10 ml de meio LB e foram incubadas por 20 horas a 37°C com agitação (200 rpm). As suspensões foram submetidas a centrifugação (10.000 x g, 5 minutos) e os sedimentos foram ressuspensos em 500 µl de meio LB. Uma alíquota de 100 µl de cada suspensão foi diluída (diluição seriada) e semeada em LB Ágar com 25 µg / ml de Imipenem para seleção de transformantes. Os experimentos foram também realizados com meio SOC e Caldo Mueller-Hinton para avaliar a possível influência do meio nos experimentos de transferência dos genes. Além disso, algumas alterações no tempo de incubação das suspensões celulares com as OMVs foram realizadas, com uma primeira incubação por 1 hora a 37°C e uma segunda incubação por 2 horas a 37°C com agitação (150 rpm), conforme descrito por Yaron et al. (2000).

Para garantir que a transferência dos genes foi mediada pelas OMVs, alguns experimentos de transformação foram realizados com OMVs previamente tratadas com 50 µg / ml de Proteinase K por 1 hora a 37°C e com 2 U de DNase I por 1 hora a 37°C. A DNase foi desnaturada por tratamento térmico a 65°C por 10 minutos.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização das cepas de *K. pneumoniae* e *K. quasipneumoniae*

4.1.1. Curvas de crescimento *in vitro*

As curvas de crescimento exibidas na Figura 1 mostram que as linhagens avaliadas de *Klebsiella spp* e *E. coli* têm comportamento similar quanto ao tempo de geração e atingem o final da fase exponencial após 8 horas de incubação, o que equivale a aproximadamente 1×10^9 ufc / ml. No entanto, a curva de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 mostra que esta cepa apresenta um crescimento um pouco mais lento durante as primeiras 2 horas em relação às outras linhagens.

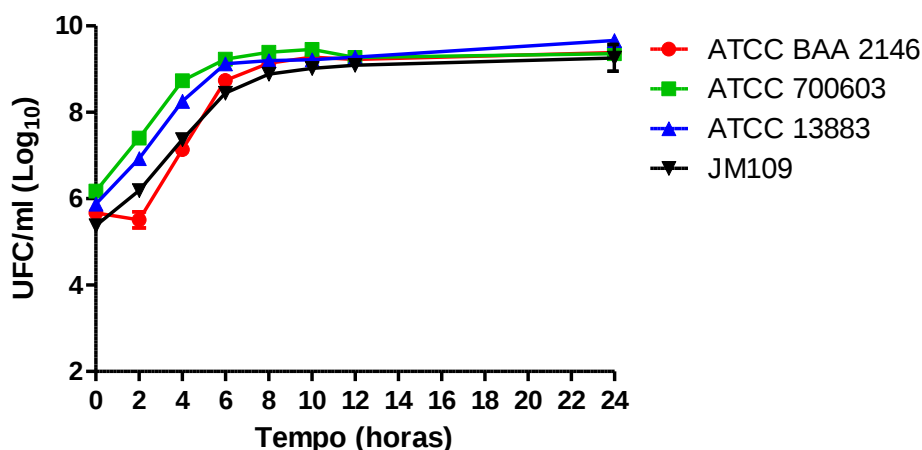


Figura 1. Curvas de crescimento das linhagens de *K. pneumoniae* (ATCC BAA-2146, ATCC 13883), *K. quasipneumoniae* (ATCC 700603) e de *E. coli* (JM109). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados apresentados são representativos dos 3 experimentos.

4.1.2. Perfil de Resistência a Antimicrobianos

A Tabela 2 apresenta os resultados dos perfis de resistência das linhagens avaliadas, confirmando a resistência de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 a todos os antimicrobianos testados, incluindo os carbapenêmicos (Ertapenem, Imipenem e Meropenem), que são um dos últimos recursos terapêuticos no tratamento de doenças e infecções causadas por bactérias gram-negativas multirresistentes (Effah et al., 2020).

Os dados obtidos mostram que *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 é resistente a alguns antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos como a amoxicilina e as cefalosporinas tais como cefotaxima, cefoxitina e ceftazidima. Além disso, é resistente à classe das fluoroquinolonas e alguns antibióticos da classe dos aminoglicosídeos como a gentamicina e amikacina. No entanto, essa linhagem é suscetível aos carbapenêmicos testados.

Tabela 2. Perfil de Resistencia a Antimicrobianos das linhagens avaliadas de *Klebsiella spp* e *E. coli*, realizado pelo Método de disco-difusão conforme o CLSI (2020).

Classe de Antibiótico	Antibiótico	ATCC BAA-2146	ATCC 700603	ATCC 13883	JM109
β-Lactâmico	Amoxicilina	R	R	R	I
β-Lactâmico	Cefotaxima	R	R	S	S
β-Lactâmico	Cefoxitina	R	R	S	S
β-Lactâmico	Ceftazidima	R	R	S	S
β-Lactâmico	Ertapenem	R	S	S	S
β-Lactâmico	Imipenem	R	S	S	S
β-Lactâmico	Meropenem	R	S	S	S
Fluoroquinolona	Ciprofloxacina	R	R	I	S
Fluoroquinolona	Enrofloxacin	R	R	S	R
Aminoglicosídeo	Estreptomicina	R	I	S	I
Aminoglicosídeo	Gentamicina	R	R	S	S
Aminoglicosídeo	Amikacina	R	R	R	R
Antagonistas do Folato	Sulfa+Trim	R	I	S	S
Tetraciclina	Tetraciclina	R	I	S	S

Legenda: S - Sensível, I - Intermediário, R – Resistente, Sulfa+Trim – Sulfametoxazol + Trimetoprima.

K. pneumoniae ATCC 13883 foi suscetível à maioria dos antibióticos testados da classe dos beta-lactâmicos como cefalosporinas e carbapenêmicos, à enrofloxacin da classe das fluoroquinolonas, à estreptomicina e gentamicina da classe dos aminoglicosídeos, aos inibidores de via de utilização do folato como Sulfametoxazol + Trimetoprima, e a tetraciclina.

A linhagem JM109 de *E. coli* usada como controle neste experimento, mostrou suscetibilidade às cefalosporinas e carbapenêmicos da classe dos beta-lactâmicos, a gentamicina da classe dos aminoglicosídeos, ao Sulfametoxazol + Trimetoprima e a tetraciclina. Os dados mostram que essa linhagem é resistente apenas à enrofloxacin e a amikacina.

Na Figura 2 são apresentados os resultados de suscetibilidade a antimicrobianos pelo Método de disco-difusão para as linhagens de *K. pneumoniae*. O painel A mostra a ausência de halos de inibição ou halos menores, indicando a resistência da linhagem ATCC BAA-2146 aos antibióticos testados. O painel B mostra a formação de halos de inibição maiores no centro da placa, considerados halos indicativos de suscetibilidade da linhagem ATCC 70603 para os antibióticos carbapenêmicos Imipenem, Ertapenem e Meropenem. Enquanto os painéis C e D mostram a formação de halos de inibição maiores em toda a placa indicando suscetibilidade das linhagens ATCC 13883 e JM 109, respectivamente para a maioria dos antibióticos testados.

A



B



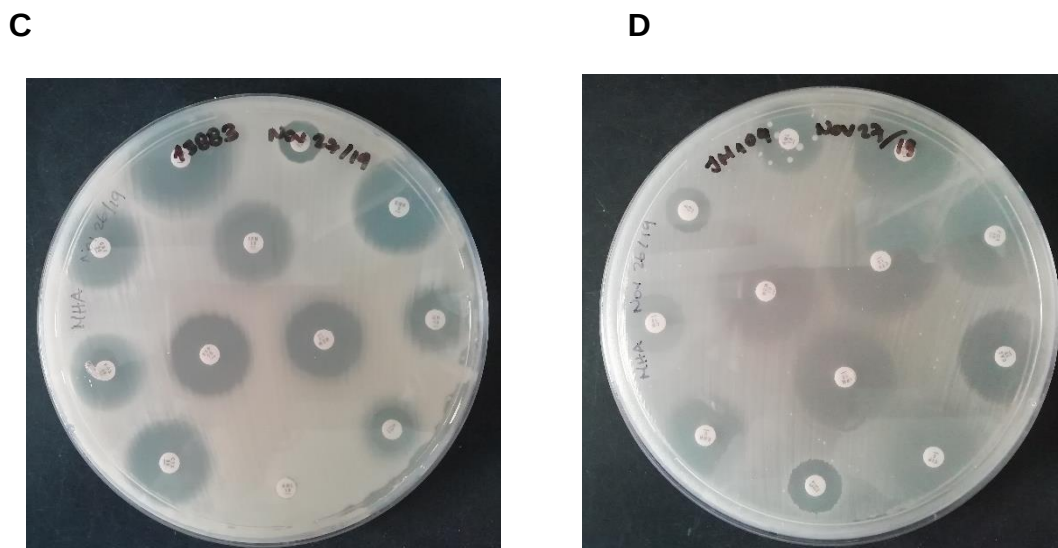


Figura 2. Placas de Petri com meio Mueller-Hinton inoculadas com culturas das linhagens de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 (A), *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 (B), *K. pneumoniae* ATCC 13883 (C) e *E. coli* JM109 (D) para determinação dos perfis de resistência a antimicrobianos pelo Método de disco-difusão.

4.1.3. Teste fenotípico para Detecção de ESBL

Dos resultados obtidos no perfil de resistência, as linhagens de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 e *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 foram resistentes às cefalosporinas e, portanto, foram testadas para produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). As linhagens de *K. pneumoniae* ATCC 13883 e *E. coli* JM109 foram usadas como controle negativo no teste.

Como esperado, *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 foi positiva para o teste porque esta linhagem é considerada como controle de qualidade para a produção de beta-lactamases de espectro estendido, conforme o CLSI (2020). Na Figura 3A se observa o perfil fenotípico característico pela formação de uma extensão da borda do halo de inibição das cefalosporinas testadas (cefotaxima e ceftazidima) em direção ao disco de amoxicilina / clavulanato, resultando em uma zona conhecida como “cortiça de champanhe” ou “buraco da fechadura”, segundo os trabalhos de Drieux et al. (2008) e Jarlier et al. (1988).

Embora a linhagem ATCC BAA-2146 fosse resistente às cefalosporinas, não apresentou o fenótipo característico da produção de ESBL porque não foi observada sinergia entre os discos, nem a formação de halos de inibição (Figura 3B). No entanto, esse resultado não pode ser considerado negativo porque segundo Munoz-Price et al.

(2013), as linhagens produtoras de carbapenemases geralmente não mostram fortes sinergias entre cefalosporina e clavulanato, típicas das linhagens produtoras de ESBL.

Ainda na Figura 3, nos painéis C e D se observam os resultados para as linhagens controles negativos no teste de ESBL. *K. pneumoniae* ATCC 13883 e *E. coli* JM109 mostraram a formação de halos de inibição ao redor dos discos de antibióticos, mas nenhuma apresentou o fenótipo característico para produção de ESBL, como esperado.

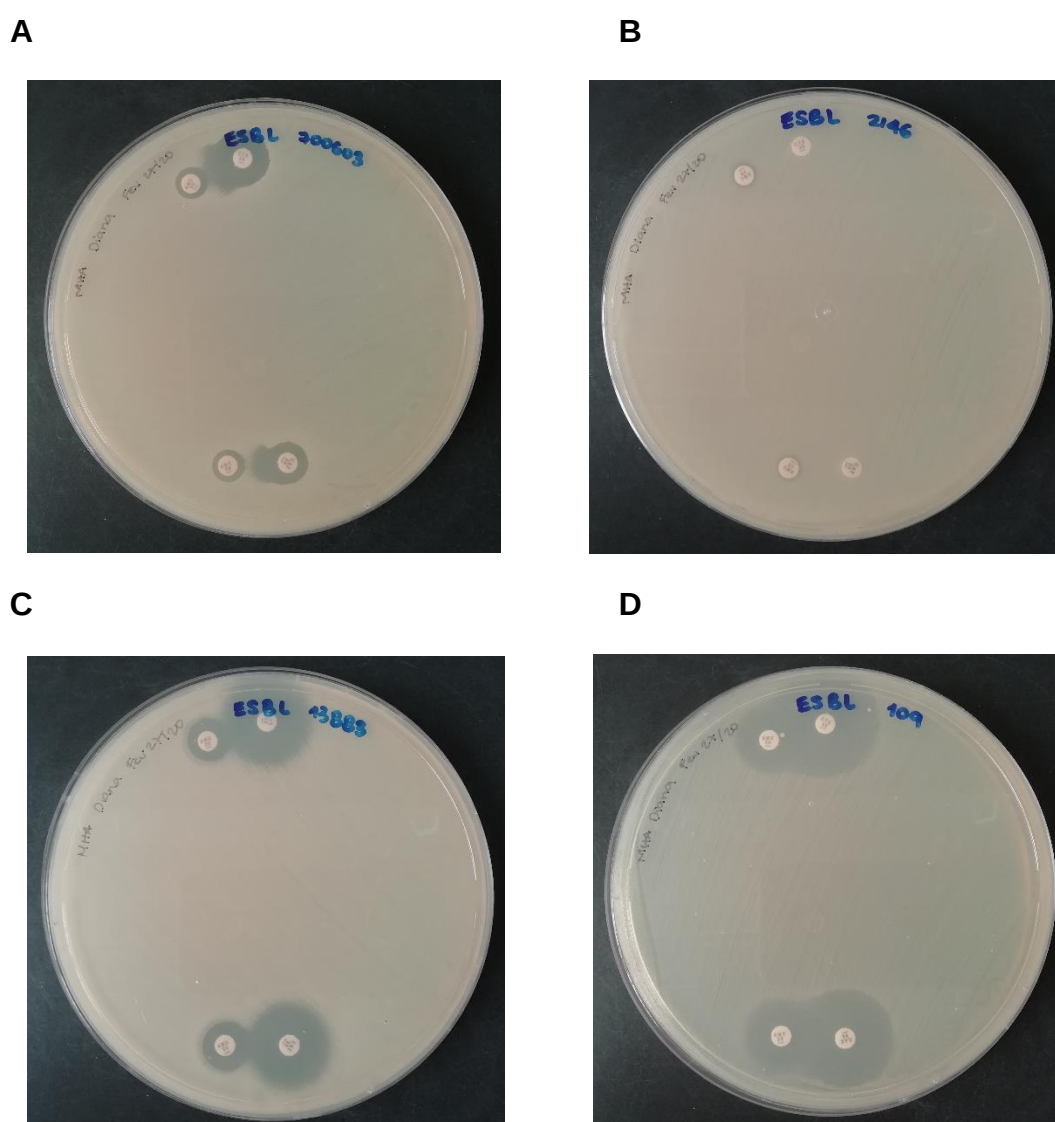


Figura 3. Placas de Petri com meio Mueller-Hinton inoculadas com as linhagens *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 (A), *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 (B), *K. pneumoniae* ATCC 13883 (C) e *E. coli* JM109 (D) para o teste fenotípico de produção

de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs). Em destaque no painel A a zona característica formada pelo efeito sinérgico dos antimicrobianos. Notar que a linhagem ATCC BAA-2146 foi resistente, enquanto as linhagens ATCC 13883 e *E. coli* JM109 foram suscetíveis.

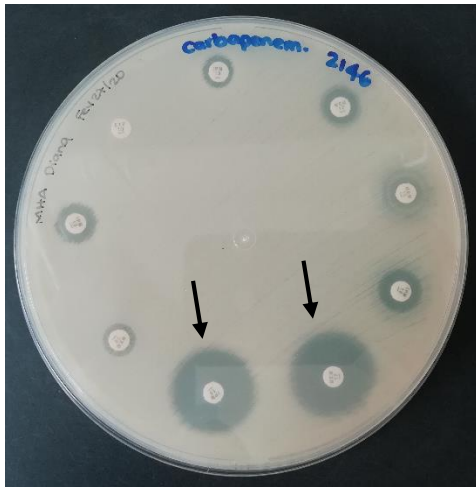
4.1.4. Teste fenotípico para Detecção de Carbapenemases

Dentre as linhagens avaliadas, apenas *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 foi resistente aos carbapenêmicos e, portanto, foi testada para produção de carbapenemases. No entanto, as outras linhagens foram usadas como controles negativos para o teste.

Como esperado, *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 foi positiva para o teste porque é uma linhagem referência para carbapenemase New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1). No experimento, ela apresentou um halo de inibição de 10 mm para o imipenem, mas quando adicionado ao disco o inibidor EDTA, o halo observado foi de 24 mm. Além disso, para o disco de Meropenem foi formado um halo de inibição de 8 mm, mas quando adicionado EDTA, o halo aumentou para 21 mm (Figura 4A). Os resultados mostram uma diferença de diâmetro ≥ 5 mm para o carbapenêmico com EDTA em relação ao carbapenêmico sem o inibidor, confirmando que essa linhagem é produtora de metallo-beta-lactamase (MBL), de acordo com a Nota Técnica da ANVISA No. 01/ 2013. A linhagem foi testada também para produção de carbapenemases de tipo KPC com e sem o inibidor Ácido fenilborônico (AFB) e para carbapenemases de tipo AmpC com e sem o inibidor Cloxacilina (CLOXA), mas os resultados foram negativos.

As outras linhagens testadas foram negativas para produção de carbapenemases de tipo MBL, KPC e AmpC, porque os halos de inibição com e sem os inibidores não tiveram uma diferença de diâmetro ≥ 5 mm, como se observa na Figura 4B para *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 e para *K. pneumoniae* ATCC 13883 (Figura 4C), uma linhagem suscetível aos carbapenêmicos segundo o trabalho de Findlay et al. (2012).

A



B



C



Figura 4. Placas de Petri com meio Mueller-Hinton inoculadas com amostras das linhagens de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 (A), *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 (B) e *K. pneumoniae* ATCC 13883 (C) para o teste fenotípico de produção de carbapenemases. Em destaque no painel A as setas indicam os halos de inibição maiores formados ao redor dos discos de Imipenem e Meropenem quando adicionado o inibidor EDTA, indicando produção de metallo-beta-lactamase (MBL).

4.1.5. Detecção de genes de resistência por PCR

A detecção dos genes de resistência *bla*_{NDM} e *bla*_{SHV} nas linhagens de *Klebsiella* spp foi realizada por PCR usando os *primers* descritos na Tabela 1. Na Figura 5 se observa o perfil eletroforético da amplificação dos genes, confirmando a presença de *bla*_{NDM} em *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 com uma banda equivalente a 621 bp e a presença de *bla*_{SHV} em *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146, *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 e *K. pneumoniae* ATCC 13883, com uma banda equivalente a 1016 bp.

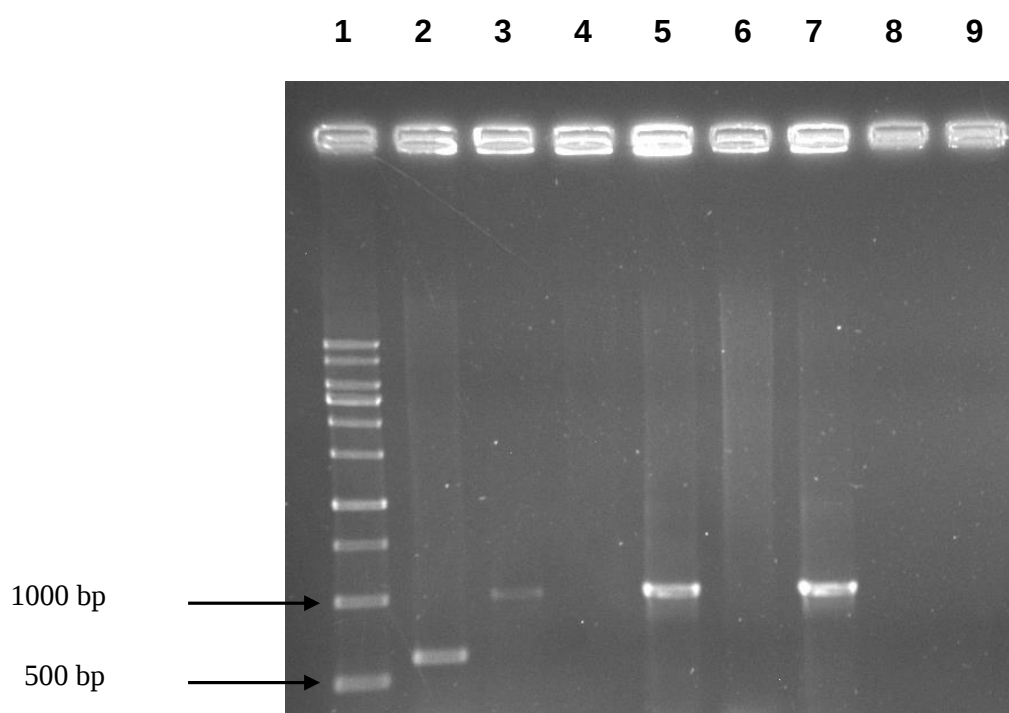


Figura 5. Gel de agarose 1% demonstrando o perfil de amplificação dos genes de resistência *bla*_{NDM} e *bla*_{SHV} nas linhagens de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146, *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 e *K. pneumoniae* ATCC 13883. 1. Marcador molecular 1kb Ladder, Ready-To-Use (Sinapse, inc.); 2. Detecção do gene *bla*_{NDM} na linhagem ATCC BAA-2146; 3. Detecção do gene *bla*_{SHV} na linhagem ATCC BAA-2146; 4. Ausência do gene *bla*_{NDM} na linhagem ATCC 700603, 5. Detecção do gene *bla*_{SHV} na linhagem ATCC 700603; 6. Ausência do gene *bla*_{NDM} na linhagem ATCC 13883; 7. Detecção do gene *bla*_{SHV} na linhagem ATCC 13883; 8. Controle negativo (mix de PCR com primers para NDM e sem bactéria); 9. Controle negativo (mix de PCR com primers para SHV e sem bactéria).

A extração dos plasmídeos das linhagens *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146, *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 e *K. pneumoniae* ATCC 13883 foi confirmada por eletroforese em gel de agarose, pela presença de perfil eletroforético compatível com os plasmídeos presentes nessas linhagens (Hudson et al., 2014; Rasheed et al., 2000) (Dados não mostrados). Após a extração dos plasmídeos, foi realizada PCR para a detecção dos genes de resistência de interesse que foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 0,7%. Na figura 6 se observa a amplificação dos genes *bla_{NDM}* e *bla_{SHV}* no DNA plasmidial da linhagem *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 e o gene *bla_{SHV}* no DNA plasmidial das linhagens *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 e *K. pneumoniae* ATCC 13883.

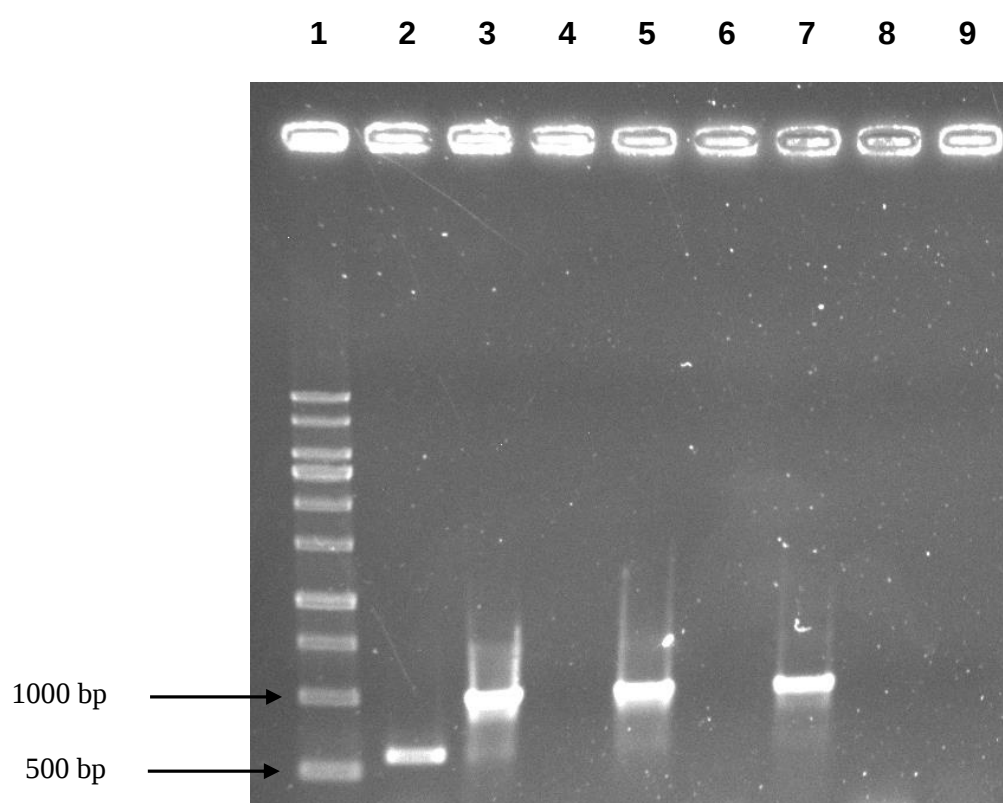


Figura 6. Gel de agarose 0,7% demonstrando a amplificação dos genes de resistência *bla_{NDM}* e *bla_{SHV}* nos plasmídeos extraídos das linhagens de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146, *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 e *K. pneumoniae* ATCC 13883. 1. Marcador molecular 1kb Ladder, Ready-To-Use (Sinapse, inc.); 2. Detecção do gene *bla_{NDM}* no DNA plasmidial da linhagem ATCC BAA-2146; 3. Detecção do gene *bla_{SHV}* no DNA plasmidial da linhagem ATCC BAA-2146; 4. Ausência do gene *bla_{NDM}* no DNA plasmidial da linhagem ATCC 700603, 5. Detecção do gene *bla_{SHV}* no DNA plasmidial da linhagem ATCC 700603; 6. Ausência do gene *bla_{NDM}* no DNA plasmidial da

linhagem ATCC 13883; 7. Detecção do gene *bla_{SHV}* no DNA plasmidial da linhagem ATCC 13883; 8. Controle negativo (mix de PCR com primers para NDM e sem DNA plasmidial); 9. Controle negativo (mix de PCR com primers para SHV e sem DNA plasmidial).

4.2. Isolamento e Purificação de OMVs

4.2.1. Quantificação e cálculo do diâmetro das OMVs

A ausência de contaminação por bactérias nas preparações das OMVs isoladas das linhagens de *Klebsiella spp* foi confirmada, uma vez que não houve crescimento de bactérias nas placas com meio LB Ágar. As OMVs foram observadas pelo analisador NanoSight NS300 (Malvern), como partículas esféricas, brancas e brilhantes com diferentes diâmetros (Figura 7).

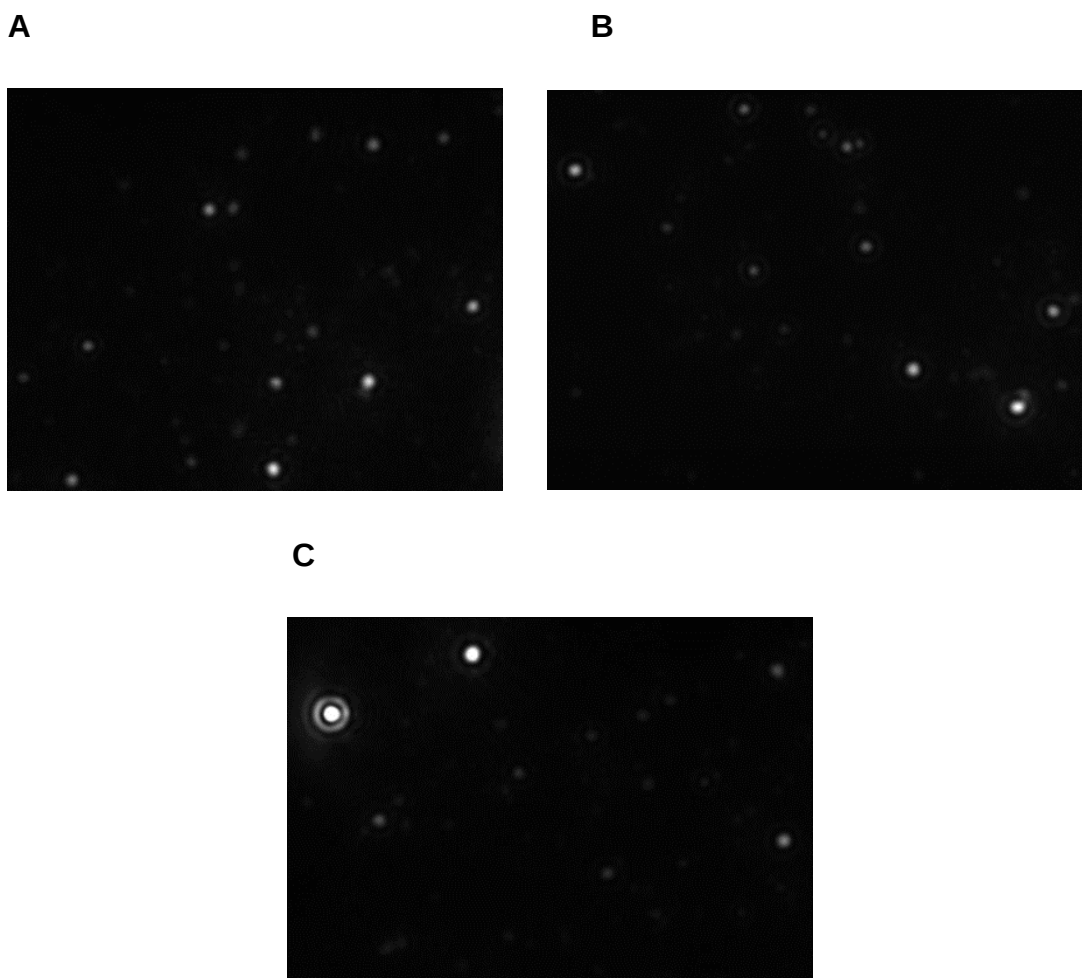
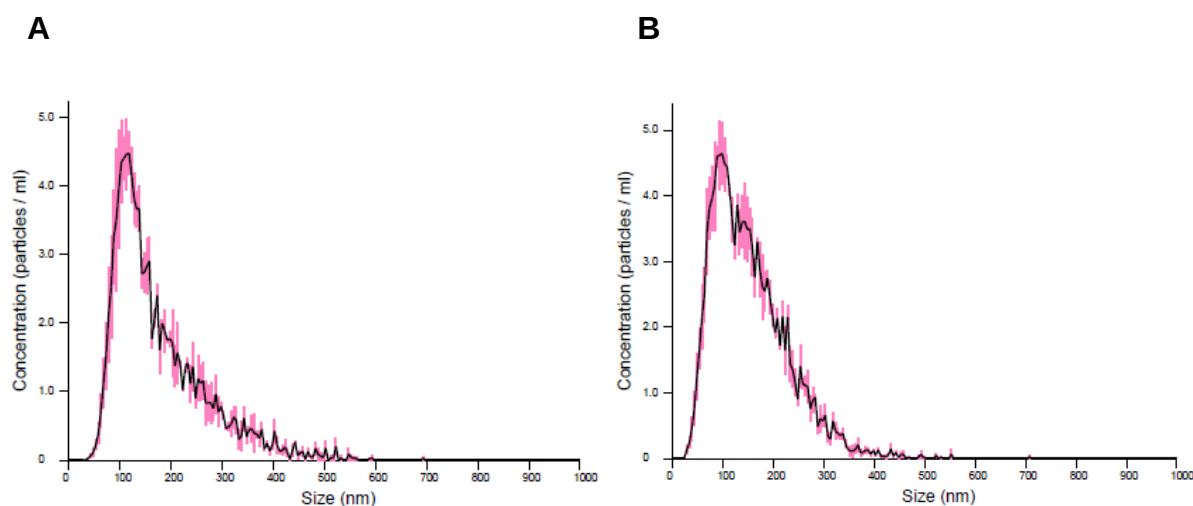


Figura 7. Vesículas da membrana externa (OMVs) isoladas das linhagens de *Klebsiella spp*. OMVs de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 (A), OMVs de *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 (B), OMVs de *K. pneumoniae* ATCC 13883 (C). As

vesículas são observadas como partículas brancas e brilhantes. Imagens obtidas com o uso do NanoSight NS300 (Malvern).

A Figura 8 mostra as concentrações e diâmetros das OMVs isoladas de *K. pneumoniae* e *K. quasipneumoniae*. As vesículas das três linhagens apresentaram diâmetros entre 30 nm e 500 nm. A linhagem ATCC BAA-2146 apresentou uma concentração de $1,13 \times 10^{12}$ vesículas / ml com um diâmetro médio de 175,1 nm, onde o diâmetro mais frequente foi de 115,2 nm. A ATCC 700603 teve uma concentração de $1,36 \times 10^{12}$ vesículas / ml com um diâmetro médio de 152,6 nm e diâmetro mais frequente de 95,7 nm. A ATCC 13883 apresentou uma concentração de $8,37 \times 10^{11}$ vesículas / ml com um diâmetro médio de 160,4 nm e diâmetro mais frequente de 100,0 nm. Segundo os dados obtidos, os diâmetros mais frequentes das OMVs das linhagens avaliadas variaram entre 95,7 nm e 115,2 nm. Além disso, a linhagem ATCC BAA-2146 apresentou as vesículas com o maior diâmetro médio e a ATCC 700603 teve as vesículas com o menor diâmetro médio.



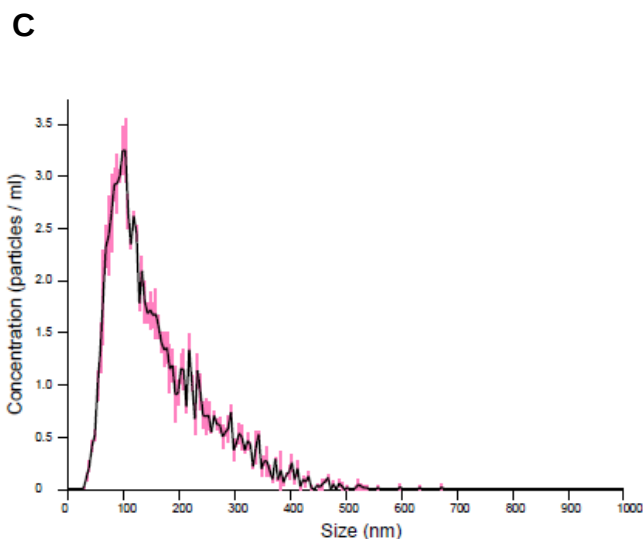


Figura 8. Concentração e diâmetro médio das OMVs isoladas das linhagens de *Klebsiella spp.* Os picos mais altos dos gráficos indicam o diâmetro mais frequente das vesículas. OMVs de ATCC BAA-2146 com diâmetro mais frequente de 115,2 nm (A), OMVs de ATCC 700603 com diâmetro mais frequente de 95,7 nm (B) e OMVs de ATCC 13883 com diâmetro mais frequente de 100,0 nm (C).

De acordo ao trabalho de Lee et al. (2012), as OMVs isoladas da linhagem ATCC 13883 apresentaram diâmetros entre 20 nm e 200 nm, onde a maioria das vesículas tinham diâmetros de 20 nm a 30 nm. You et al. (2018) obtiveram vesículas dessa linhagem com diâmetros entre 30 nm e 100 nm onde a maioria tinha diâmetros de 40 nm e 60 nm. No entanto, nosso trabalho relata vesículas com diâmetros entre 30 nm e 500 nm onde a maioria tem diâmetro de 100,0 nm. A diferença entre os dados obtidos provavelmente tem a ver com a fase de crescimento em que as vesículas foram isoladas, conforme discutido por Klimentová e Stulík (2015) que propõem que o processo de vesiculação é influenciado pela fase de crescimento. Além disso, a diferença nos dados obtidos provavelmente tem relação com o método utilizado para calcular o diâmetro das vesículas pois Lee et al. (2012) e You et al. (2018) usaram o TEM e em nosso estudo foi usado o NTA. Como discutido por Gandham et al. (2020) e Bachurski et al. (2019) as preparações de TEM causam desidratação e encolhimento das vesículas e portanto, não pode ser considerado uma referência para avaliar o tamanho real das OMVs. Em contrapartida, o NTA usado neste estudo, é considerado um dos métodos mais precisos para calcular o tamanho das OMVs quando comparado com outras técnicas (Bachurski et al., 2019; Théry et al., 2018; Shao et al., 2018).

4.2.2. Quantificação do conteúdo de proteínas das OMVs

O teste de Bradford foi realizado usando soluções com diferentes concentrações de BSA (albumina bovina sérica) e suspensões de OMVs produzidas pelas linhagens de *Klebsiella spp.* Na Figura 9 se observa a cor das amostras pela formação de um complexo entre o azul brilhante de coomassie do reagente de Bradford e as proteínas em solução. As soluções da BSA (poços 2-7) mostram uma mudança da cor de acordo à concentração de proteína, onde a menor concentração está no poço 2 e a maior concentração no poço 7. As soluções de OMVs (poços 8-10) apresentaram uma cor semelhante aos primeiros poços da BSA, indicando que possivelmente as OMVs têm uma baixa concentração de proteínas.

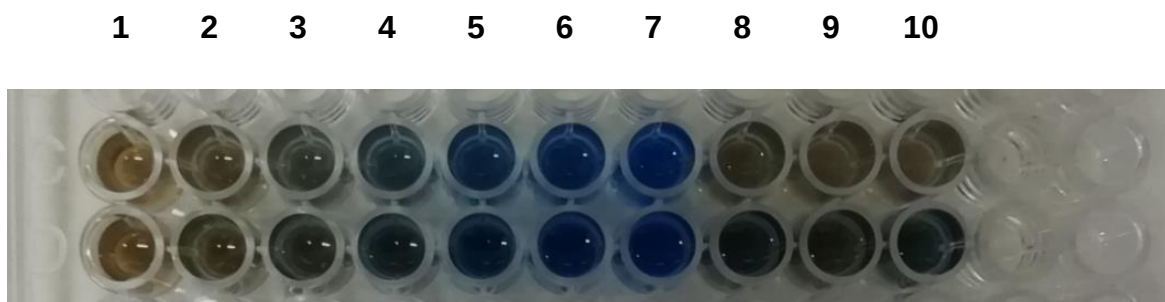


Figura 9. Quantificação de proteínas pelo Método de Bradford usando diferentes concentrações da proteína padrão BSA (poços 2-7) e soluções das OMVs das linhagens de *Klebsiella spp* (poços 8-10). 1. Branco (agua); 2. BSA 0,06 mg / ml; 3. BSA 0,125 mg / ml; 4. BSA 0,25 mg / ml; 5. BSA 0,5 mg / ml; 6. BSA 1 mg / ml; 7. BSA 2 mg / ml; 8. OMVs de ATCC BAA-2146; 9. OMVs de ATCC 700603; 10. OMVs de ATCC 13883.

Após fazer a leitura da absorbância de todas as amostras, foi obtida a curva padrão da proteína BSA (Figura 10) e, portanto, a concentração de proteínas para cada amostra de OMVs. As OMVs da linhagem ATCC BAA-2146 apresentaram uma concentração de proteínas de 0,27 mg / ml, as OMVs de ATCC 700603 uma concentração de proteínas de 0,10 mg / ml e as OMVs de ATCC 13883 tiveram a maior concentração de proteínas com 0,30 mg / ml (Tabela 3).

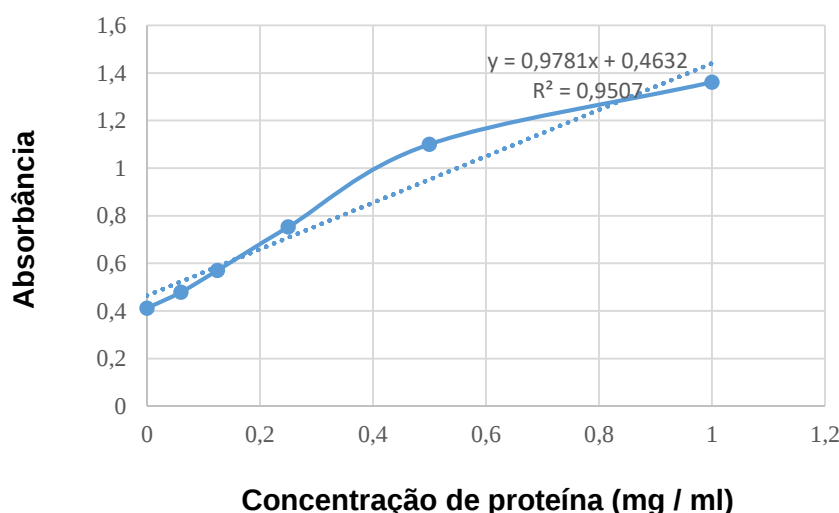


Figura 10. Curva padrão da proteína BSA que mostra a relação entre a absorbância e a concentração de proteína. Com os dados das absorbâncias das amostras de OMVs, foram obtidas as concentrações de proteínas.

Tabela 3. Absorbância e concentração de proteínas das amostras de OMVs produzidas pelas linhagens de *Klebsiella spp*, de acordo à curva padrão da BSA.

Amostra	Absorbância	Concentração de proteínas (mg / ml)
OMVs de ATCC BAA-2146	0,728	0,27
OMVs de ATCC 700603	0,563	0,10
OMVs de ATCC 13883	0,757	0,30

4.2.3. Detecção de genes de resistência nas OMVs

A detecção dos genes de resistência *bla*_{NDM} e *bla*_{SHV} nas OMVs produzidas pelas linhagens de *K. pneumoniae* e *K. quasipneumoniae*, foi realizada por PCR, conforme apresentado anteriormente, usando os *primers* descritos na Tabela 1. Na Figura 11 observa-se o perfil eletroforético da amplificação dos genes de interesse nas OMVs sem tratamento com DNase I, confirmando a presença do gene *bla*_{NDM} apenas nas vesículas de ATCC BAA-2146, com uma banda equivalente a 621 bp. O gene *bla*_{SHV} foi detectado nas vesículas de ATCC 700603, ATCC 13883 e ATCC BAA-2146 com uma banda equivalente a 1016 bp, embora o teste fenotípico para detecção de beta-

lactamases de espectro estendido (ESBL) foi negativo para as linhagens ATCC BAA-2146 e ATCC 13883.

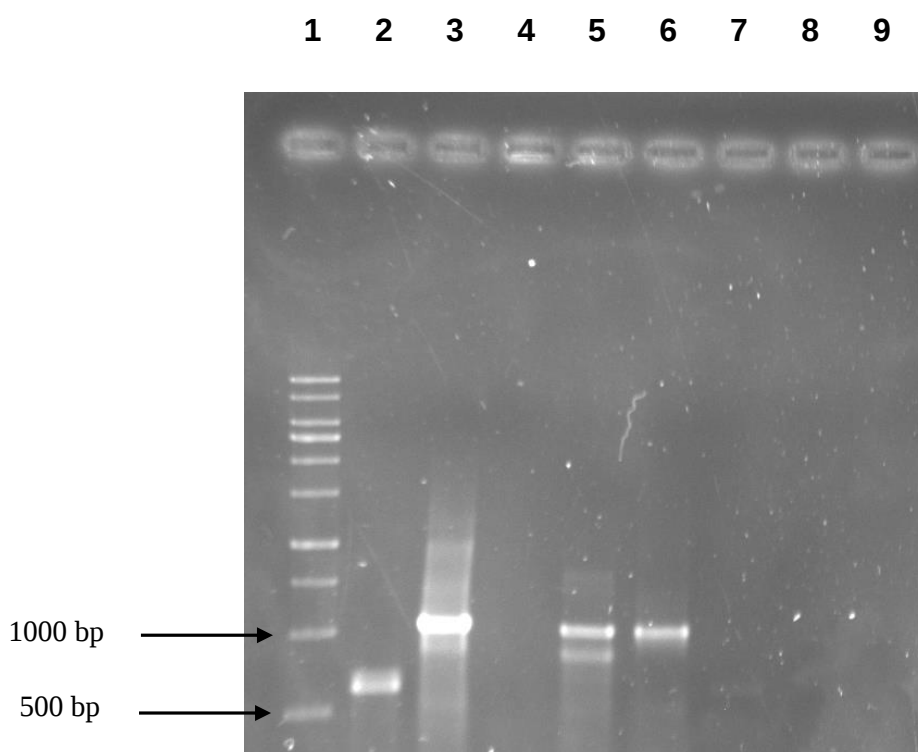


Figura 11. Gel de agarose 1% demonstrando o perfil de amplificação dos genes de resistência *bla_{NDM}* e *bla_{SHV}* nas OMVs produzidas pelas linhagens de *K. pneumoniae* e *K. quasipneumoniae*, sem tratamento com DNase I. 1. Marcador molecular 1kb Ladder, Ready-To-Use (Sinapse, inc.); 2. Detecção do gene *bla_{NDM}* nas OMVs de ATCC BAA-2146; 3. Detecção do gene *bla_{SHV}* nas OMVs de ATCC 700603; 4. Ausência do gene *bla_{NDM}* nas OMVs de ATCC 13883; 5. Detecção do gene *bla_{SHV}* nas OMVs de ATCC 13883; 6. Detecção do gene *bla_{SHV}* nas OMVs de ATCC BAA-2146; 7. Ausência do gene *bla_{NDM}* nas OMVs de ATCC 700603; 8. Controle negativo (mix de PCR com primers para NDM e sem OMVs); 9. Controle negativo (mix de PCR com primers para SHV e sem OMVs).

Amostras de OMVs tratadas com DNase I e Triton X-100 foram usadas para fazer a detecção dos genes de resistência *bla_{NDM}* e *bla_{SHV}* por PCR. Na Figura 12 se observa o perfil eletroforético da amplificação dos genes nas vesículas tratadas confirmando a presença do gene *bla_{SHV}* nas OMVs das linhagens ATCC BAA-2146,

ATCC 700603 e ATCC 13883. No entanto, o gene *bla_{NDM}* não foi detectado nas vesículas de nenhuma das linhagens avaliadas.

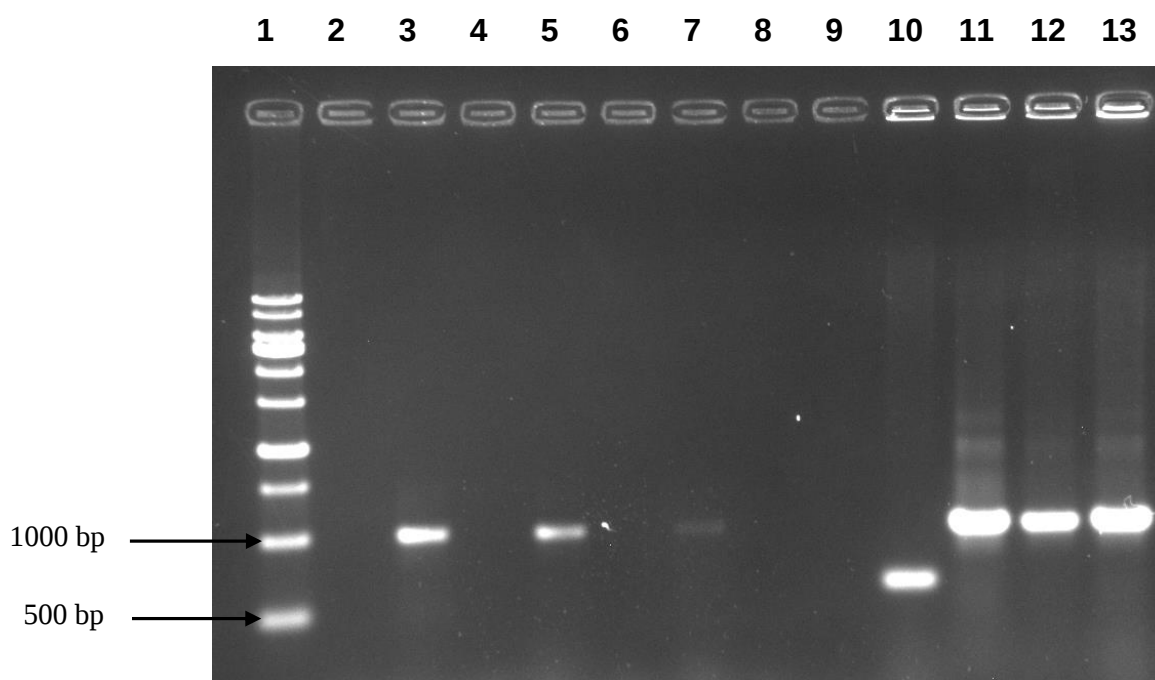


Figura 12. Gel de agarose 1% demonstrando o perfil de amplificação dos genes de resistência *bla_{NDM}* e *bla_{SHV}* nas OMVs produzidas pelas linhagens de *K. pneumoniae* e *K. quasipneumoniae*. As OMVs foram tratadas com DNase I e Triton X-100. 1. Marcador molecular 1kb Ladder, Ready-To-Use (Sinapse, inc.); 2. Ausência do gene *bla_{NDM}* nas OMVs de ATCC BAA-2146; 3. Detecção do gene *bla_{SHV}* nas OMVs de ATCC BAA-2146; 4. Ausência do gene *bla_{NDM}* nas OMVs de ATCC 700603; 5. Detecção do gene *bla_{SHV}* nas OMVs de ATCC 700603; 6. Ausência do gene *bla_{NDM}* nas OMVs de ATCC 13883; 7. Detecção do gene *bla_{SHV}* nas OMVs de ATCC 13883; 8. Controle negativo (mix de PCR com primers para NDM e sem OMVs); 9. Controle negativo (mix de PCR com primers para SHV e sem OMVs); 10. Controle positivo (gene *bla_{NDM}* na linhagem ATCC BAA-2146); 11. Controle positivo (gene *bla_{SHV}* na linhagem ATCC BAA-2146); 12. Controle positivo (gene *bla_{SHV}* na linhagem ATCC 700603); 13. Controle positivo (gene *bla_{SHV}* na linhagem ATCC 13883).

Como discutido no trabalho de Munoz-Price et al. (2013), as linhagens produtoras de carbapenemases como ATCC BAA-2146, geralmente não apresentam o fenótipo característico das linhagens positivas para ESBL. Além disso, Hudson et al.

(2014) descreveram o repertório de genes de resistência a antibióticos dessa linhagem, confirmando a presença de um gene para beta-lactamase de tipo SHV no plasmídeo pKpn2146b, considerado como o plasmídeo mais rico em determinantes de resistência.

Que seja de nosso conhecimento, ainda não existem trabalhos sobre vesículas produzidas por essa linhagem e por tanto, nosso trabalho é o primeiro em descrever as OMVs da *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 e confirmar a presença do gene bla_{SHV} nessas OMVs.

Fuursted et al. (2012) detectaram a presença do gene bla_{SHV} na linhagem de *K. pneumoniae* ATCC 13883 através de PCR, concordando com os dados obtidos em nosso trabalho. Apesar dos estudos realizados sobre as OMVs isoladas dessa linhagem (You et al., 2019; You et al., 2018; Lee et al., 2012), o gene ainda não foi relatado nas vesículas.

Ainda que as vesículas isoladas das três linhagens de *Klebsiella spp* contêm o gene bla_{SHV}, cada linhagem apresenta um tipo diferente de beta-lactamases do tipo SHV, como demonstrado por Rasheed et al. (2000) para ATCC 700603 com a enzima SHV-18, Fuursted et al. (2012) para ATCC 13883 com SHV-1 e Hudson et al. (2014) para ATCC BAA-2146 com SHV-11.

Estudos sobre vesículas de membrana externa produzidas por bactérias Gram negativas patogênicas, propõem que a maior parte do DNA associado às OMVs pode ser removido usando tratamento com DNase, sugerindo que o DNA está localizado principalmente na superfície externa das vesículas e apenas uma baixa concentração desse material pode ser encontrada em seu interior (Bitto et al. 2017). Em consequência, os resultados obtidos na detecção do gene bla_{NDM} nas OMVs de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 submetidas ao tratamento com DNase I (Figura 11) e sem tratamento (Figura 12), podem sugerir que o gene provavelmente pode estar associado à superfície das OMVs uma vez que não foi detectado após o tratamento com DNase e, por tanto o gene foi possivelmente degradado.

4.3. Caracterização de OMVs por Microscopia Eletrônica

As preparações de OMVs das linhagens de *Klebsiella spp* foram transferidas para as redes de cobre revestidas com formvar e carbono e após tratadas com o

Acetato de Uranila 2%, foram analisadas por microscópio eletrônico de transmissão. No entanto, as imagens obtidas indicaram uma possível degradação das vesículas, provavelmente devido ao longo tempo de armazenamento. Estudos sobre a estabilidade das vesículas durante o armazenamento em diferentes condições, demonstraram que -80°C é a melhor temperatura para preservar suas propriedades físicas e funcionais (Gandham et al., 2020; Jeyaram e Jay, 2017; Kusuma et al., 2018; Lórinicz et al., 2014; Witwer et al., 2013). Porém, o armazenamento de longo prazo pode causar perda da funcionalidade, aumento no tamanho e redução na concentração das vesículas, possivelmente devido à agregação ou desintegração das mesmas, o que tende a aumentar com o tempo de armazenamento (Cheng et al., 2019; Schulz et al., 2018; Park et al., 2018; Maroto et al., 2017; Lórinicz et al., 2014; Arigita et al., 2004). Assim, alguns estudos propõem manter as vesículas a -80°C preferencialmente não mais que 7 dias, embora recomendem o uso de preparações frescas de vesículas para análise funcional (Schulz et al., 2018; Lórinicz et al., 2014).

Preparações frescas de OMVs das linhagens de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146, *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 e *K. pneumoniae* ATCC 13883 foram transferidas para as redes de cobre, tratadas com o Acetato de Uranila 2% e observadas no microscópio eletrônico. As imagens obtidas revelaram que as linhagens de *Klebsiella spp.* produzem vesículas esféricas de membrana dupla com tamanhos menores que 200 nm, durante a fase estacionária do cultivo *in vitro* (Figura 13), mostrando relação com os diâmetros calculados para as OMVs usando o NTA.

Que seja de nosso conhecimento, não existem estudos sobre as vesículas produzidas por *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 e *K. pneumoniae* 700603 e, por tanto, este trabalho é o primeiro em caracterizar as OMVs dessas linhagens.

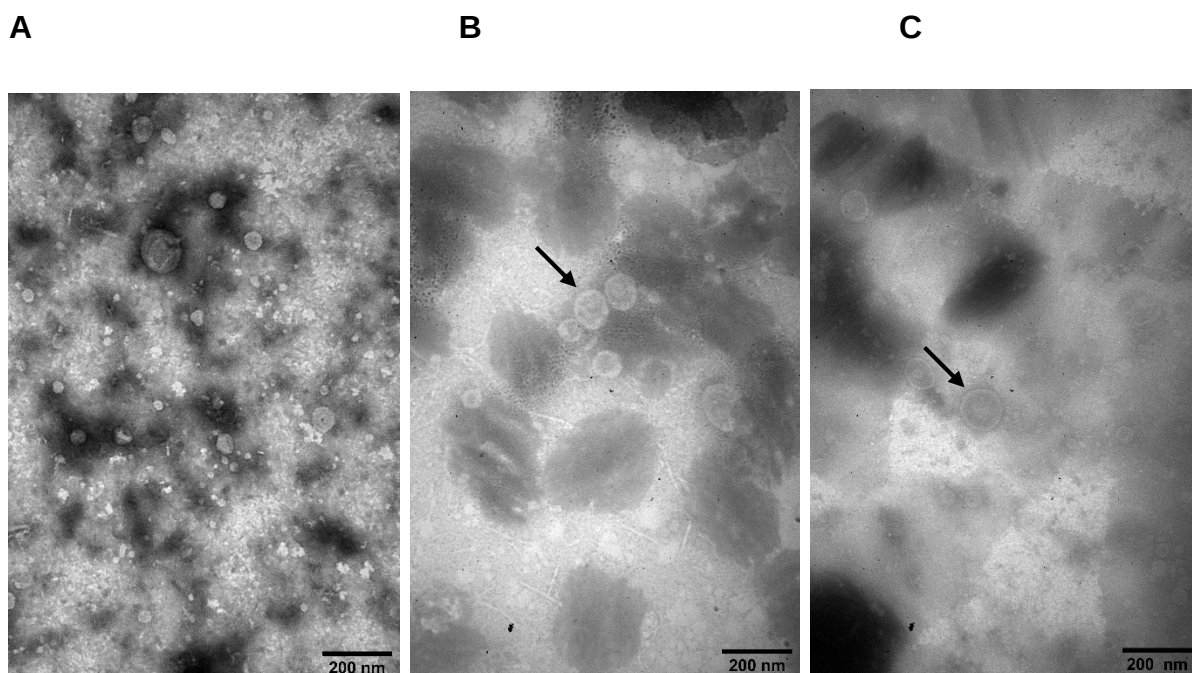


Figura 13. Microscopia eletrônica de transmissão de OMVs produzidas por *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 (A), *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 (B) e *K. pneumoniae* ATCC 13883 (C). OMVs foram isoladas de culturas *in vitro* em fase estacionária por ultrafiltração e ultracentrifugação. Nos painéis B e C as setas indicam vesículas esféricas com aparência de membrana dupla.

4.4. Transferência de carbapenemase e ESBLs de OMVs para as cepas bacterianas de laboratório

Um total de três experimentos foram realizados usando OMVs de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 para verificar a possibilidade de transferência do gene bla_{NDM} às linhagens *K. pneumoniae* ATCC 13883 e *E. coli* JM109, mediada por OMVs. No primeiro experimento foi usada a linhagem ATCC 13883 como receptora crescida em meio LB e quatro concentrações diferentes (1, 5, 10, 20 µg), baseada na quantificação de proteínas de OMVs de ATCC BAA-2146, previamente tratadas com Proteinase K e DNase I. No segundo experimento, foi usada a linhagem JM109 como receptora crescida em meio LB e uma concentração de 5 µg de OMVs, também baseada na quantificação de proteínas de ATCC BAA-2146, com o tratamento prévio com Proteinase K e DNase I. No terceiro experimento, foi usada JM109 crescida em meio LB e uma concentração de 10 µg das OMVs de ATCC BAA-2146, sem tratamento prévio com Proteinase K e DNase I. Nos três tratamentos, as bactérias receptoras e as

vesículas foram submetidas a uma incubação estática por 3 horas a 37°C e uma incubação com agitação (150 rpm) por 3 horas a 37°C. Embora os experimentos fossem realizados sob condições diferentes, não foi possível obter recombinantes. É possível que a não constatação de transferência seja devido a degradação estrutural das vesículas ao longo do processo de armazenamento por 45 dias. De fato, Chatterjee et al. (2017) demonstraram que o número máximo de transformantes com OMVs de *Acinetobacter baumannii* foi obtido no primeiro dia de armazenamento das vesículas, embora tenham conseguido obter alguns transformantes com vesículas armazenadas até 15 dias. No entanto, neste trabalho, nenhum transformante foi obtido com vesículas armazenadas até 30 dias após o preparo, indicando que as OMVs bacterianas perdem algumas propriedades se o armazenamento a -80°C é por um período superior a 15 dias. Esses dados são reforçados pelos resultados de TEM observados por nós. Não podemos, no entanto, descartar que genes de resistência não são transferidos por OMVs de *K. pneumoniae*, ao menos para as linhagens deste estudo.

Para responder a esta pergunta, novos experimentos de transferência de genes foram realizados com preparações de vesículas recentes sem tratamento prévio com Proteinase K e DNase I. No primeiro experimento, foi usada a linhagem *E. coli* JM109 como receptora crescida em meio Caldo Mueller-Hinton e uma concentração de 10 µg de OMVs isoladas de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146. No segundo experimento, foi usada a mesma linhagem como receptora crescida em meio SOC e a mesma concentração de OMVs de ATCC BAA-2146. No entanto, neste experimento as condições de incubação da bactéria com as vesículas foram alteradas e, portanto, foi realizada uma incubação estática por 1 hora a 37°C seguida de uma incubação com agitação (150 rpm) durante 2 horas a 37°C, segundo o trabalho de Yaron et al. (2000). Ainda que diferentes meios de cultura tenham sido usados para os experimentos de transformação e diferentes condições de incubação das bactérias receptoras com as vesículas, não foi possível obter transformantes. Provavelmente, os resultados têm a ver com o fato que as OMVs da linhagem de *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 necessitam de algumas condições especiais para transferir o gene de resistência *bla_{NDM}* para outras cepas bacterianas, o que deve ser avaliado em experimentos futuros.

5. Conclusões

Em conclusão, os resultados obtidos neste trabalho confirmaram o perfil de resistência de cada uma das linhagens de *Klebsiella spp.* mostrando que *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 é resistente a todos os antibióticos testados, incluindo betalactâmicos da classe dos carbapenêmicos, por causa da presença do gene *bla_{NDM}* que produz a carbapenemase NDM-1. Além disso, foi demonstrado que a linhagem *K. quasipneumoniae* ATCC 700603 é resistente à maioria dos antibióticos, incluindo as cefalosporinas, devido a presença do gene *bla_{SHV}*, responsável da produção da beta-lactamase de espectro estendido SHV-18. Em contraste, para a linhagem *K. pneumoniae* ATCC 13883 sua suscetibilidade à maioria dos antibióticos avaliados foi confirmada pois, embora apresente o gene *bla_{SHV}*, a beta-lactamase de amplo espectro produzida (SHV-1) não tem a capacidade de hidrolisar antibióticos como cefalosporinas e carbapenêmicos.

Neste estudo foi demonstrado que as três linhagens de *Klebsiella spp.* avaliadas podem produzir vesículas de membrana externa (OMVs) durante sua fase estacionária a partir de culturas *in vitro*. As análises de NTA demonstraram que as vesículas podem ter diâmetros entre 30 nm e 500 nm com predomínio de diâmetros menores que 200 nm, como confirmado por microscopia eletrônica de transmissão. Além disso, nesta fase de crescimento, essas linhagens podem produzir OMVs em concentrações desde $8,37 \times 10^{11}$ vesículas/ml a $1,36 \times 10^{12}$ vesículas/ml, com aparência esférica e de membrana dupla, confirmado por análises NTA e TEM, respectivamente.

Além de confirmar a presença dos genes de resistência *bla_{NDM}* e *bla_{SHV}* nas linhagens de *Klebsiella spp.*, nossos resultados demonstraram que as vesículas de membrana externa produzidas por ATCC BAA-2146, ATCC 700603 e ATCC 13883 contêm o gene *bla_{SHV}*. Em relação ao gene *bla_{NDM}*, sua presença nas OMVs de ATCC BAA-2146 foi demonstrada apenas em alguns experimentos e, por tanto, seu empacotamento nas vesículas provavelmente necessita de condições especiais que devem ser analisadas.

Ainda que experimentos de transferência de genes foram realizados usando diferentes bactérias receptoras, meios de cultura e condições de incubação, não foi possível obter transformantes devido provavelmente a que as OMVs de ATCC BAA-

2146 necessitam condições especiais para fazer a transferência do gene *bla_{NDM}* para outras bactérias.

Os dados obtidos neste trabalho, sugerem que o armazenamento por longo tempo pode degradar as vesículas da membrana externa produzidas pelas linhagens de *Klebsiella spp.* afetando sua estabilidade e propriedades físicas, como demonstrado em análises de microscopia eletrônica. Além disso, é possível que o armazenamento ao longo prazo tenha afetado a capacidade das OMVs de transferir os genes de resistência para as bactérias receptoras nos primeiros experimentos realizados com vesículas armazenadas a -80°C durante 45 dias.

6. Perspectivas futuras

Os resultados obtidos neste estudo permitiram uma melhor compreensão da importância biológica das vesículas de membrana externa produzidas por bactérias gram negativas como mecanismos de patogenicidade e de transferência horizontal de genes que contribuem para a resistência antimicrobiana. Embora este trabalho tenha demonstrado a produção de vesículas a partir de três linhagens diferentes de *Klebsiella spp.* e a presença do gene de resistência *bla_{SHV}* responsável pela expressão de ESBLs, análises do conteúdo de RNA e proteína podem revelar novas funções dessas vesículas. Além disso, vesículas produzidas por linhagens de importância clínica como *Klebsiella spp.* poderiam ser usadas como veículos de entrega de medicamentos e vacinas para o tratamento de doenças infecciosas.

7. Referências

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). NOTA TÉCNICA N° 01/2013: Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multirresistentes. 2013. Brasília.
- Anand D, Chaudhuri A. Bacterial outer membrane vesicles: New insights and applications. *Molecular Membrane Biology*. 2016; 33 (6 - 8): 125-137.
- Arigita C, Jiskoot Westdijk J, Ingen CV, Hennink WE, Crommelin DJA, Kersten GFA. Stability of mono- and trivalent meningococcal outer membrane vesicle vaccines. *Vaccine*. 2004; 22: 629-642.
- Bitto NJ, Kaparakis-Liaskos M. The Therapeutic Benefit of Bacterial Membrane Vesicles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18 (1287): 1-15.
- Bachurski D, Schuldner M, Nguyen P-H, Malz A, Reiners KS, Grenzi PC, Babatz F, Schauss A, Hansen HP, Hallek M, von Strandmann EP. Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis – An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2019; 8 (1596016): 1-18.
- Bitto NJ, Chapman R, Pidot S, Costin A, Lo C, Choi J, D'Cruze T, Reynolds EC, Dashper SG, Turnbull L, Whitchurch CB, Stinear TP, Stacey KJ, Ferrero RL. Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Scientific Reports*. 2017; 7 (7072): 1-11.
- Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-254.
- Bhar S, Edelmann MJ, Jones MK. Characterization and proteomic analysis of outer membrane vesicles from a commensal microbe, *Enterobacter cloacae*. *Journal of Proteomics*. 2021; 231 (103994): 1-9.
- Brisse S, Verhoef, J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001; 51: 915-924.

- Brisse S, van Himbergen T, Kusters K, Verhoef J. Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004; 10 (10): 942-945.
- Brisse S, Passet V, Grimont PAD. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014; 64: 3146-3152.
- Cahill BK, Seeley KW, Gutel D, Ellis TN. *Klebsiella pneumoniae* O antigen loss alters the outer membrane protein composition and the selective packaging of proteins into secreted outer membrane vesicles. *Microbiological Research*. 2015; 180:1-10.
- Chatterjee S, Mondal A, Mitra S, Basu S. *Acinetobacter baumannii* transfers the bla_{NDM-1} gene via outer membrane vesicles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017; 72 (8): 2201-2207.
- Cheng Y, Zeng Q, Han Q, Xia W. Effect of pH, temperature and freezing-thawing on quantity changes and cellular uptake of exosomes. *Protein Cell*. 2019; 10 (4): 295-299.
- Chutkan H, MacDonald I, Manning A, Kuehn MJ. Quantitative and qualitative preparations of bacterial outer membrane vesicles. *Methods Mol Biol*. 2013; 966: 259-272.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard-12th ed. CLSI document M02-A12. 2015. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. 2020. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

- Doorduyn DJ, Rooijackers SHM, van Schaik W, Bardoel BW. Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. Immunobiology. 2016; 221: 1102-1109.
- Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. Clinical Microbiology and Infection. 2008; 14 (Suppl.1): 90-103.
- Effah CY, Sun T, Liu S, Wu Y. *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2020; 19 (1): 1-9.
- Elliott AG, Ganesamoorthy D, Coin L, Cooper MA, Cao MD. Complete Genome Sequence of *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* Strain ATCC 700603. Genome Announcements. 2016; 4 (3): e00438-16. Published 2016 May 26. doi:10.1128/genomeA.00438-16.
- Ellis TN, Kuehn MJ. Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2010; 74 (1): 81-94.
- Findlay J, Hamouda A, Dancer SJ, Amyes SGB. Rapid acquisition of decreased carbapenem susceptibility in a strain of *Klebsiella pneumoniae* arising during meropenem therapy. Clinical Microbiology and Infection. 2012; 18: 140-146.
- Fuursted K, Scholer L, Hansen F, Dam K, Bojer MS, Hammerum AM, Dagnaes-Hansen F, Olsen A, Jasemian Y, Struve C. Virulence of a *Klebsiella pneumoniae* strain carrying the New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1). Microbes and Infection. 2012; 14: 155-158.
- Gandham S, Su X, Wood J, Nocera AL, Alli SC, Milane L, Zimmerman A, Amiji M, Ivanov AR. Technologies and Standardization in Research on Extracellular Vesicles. Trends in Biotechnology. 2020; 1-33.
- Gill S, Catchpole R, Forterre P. Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond. FEMS Microbiology Reviews. 2018; 042: 1-31.
- Gomez-Simmonds A, Uhlemann A-C. Clinical Implications of Genomic Adaptation and Evolution of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. The Journal of Infectious Diseases. 2017; 215 (S1): 18-27.

- Granata G, Petrosillo N. Resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*: a 4.0 strain? Infectious Disease Reports. 2017; 9 (7104): 69-72.
- Haque M, Sartelli M, McKimm J, Bakar MA. Health care-associated infections – an overview. Infection and Drug Resistance. 2018; 11: 2321-2333.
- Hendrik TC, Voor in 't holt AF, Vos MC. Clinical and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella* spp.: A Systematic Review and Meta-Analyses. PLOS ONE. 2015; 10 (10): 1-23.
- Hudson CM, Bent ZW, Meagher RJ, Williams KP. Resistance Determinants and Mobile Genetic Elements of an NDM-1-Encoding *Klebsiella pneumoniae* Strain. PLOS ONE. 2014; 9 (6): 1-14.
- Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance No Time to Wait: Securing the Future from Drug-Resistant Infections Report to the Secretary-General of the United Nations. 2019 Apr. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/detail/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>.
- Jan AT. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. Frontiers in Microbiology. 2017; 8 (1053): 1-11.
- Jarlier V, Nicolas M-H, Fournier G, Philippon, A. Extended Broad-Spectrum β -Lactamases Conferring Transferable Resistance to Newer β -Lactam Agents in Enterobacteriaceae: Hospital Prevalence and Susceptibility Patterns. Reviews of Infectious Diseases. 1988; 10 (4): 867-878.
- Jeyaram A, Jay SM. Preservation and Storage Stability of Extracellular Vesicles for Therapeutic Applications. The AAPS Journal. 2017; 20 (1): 1-7.
- Khan H, Baig F, Mehboob R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2017, 7 (5): 478-482.
- Klimentová J, Stulík J. Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. Microbiological Research. 2015; 170: 1-9.

- Kusuma GD, Barabadi M, Tan JL, Morton DAV, Frith JE, Lim R. To Protect and to Preserve: Novel Preservation Strategies for Extracellular Vesicles. *Frontiers in Pharmacology*. 2018; 9 (1199): 1-17.
- Lee JC, Lee EJ, Lee JH, Jun SH, Choi CW, Kim SI, Kang SS, Hyun S. *Klebsiella pneumoniae* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. *FEMS Microbiology Letters*. 2012; 331: 17-24.
- Lee W-H, Choi H-I, Hong S-W, Kim K-s, Gho YS, Jeon SG. Vaccination with *Klebsiella pneumoniae*-derived extracellular vesicles protects against bacteria-induced lethality via both humoral and cellular immunity. *Experimental & Molecular Medicine*. 2015; 47 (183): 1-9.
- Lee C-R, Lee JH, Park KS, Jeon JH, Kim YB, Cha C-J, Jeong BC, Lee SH. Antimicrobial resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017; 7 (483): 1-13.
- Long SW, Linson SE, Ojeda Saavedra M, Cantu C, Davis JJ, Brettin T, Olsen RJ. Whole-Genome Sequencing of Human Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates Reveals Misidentification and Misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. *mSphere*. 2017; 2 (4): 1-15.
- Lórinicz ÁM, Timár CI, Marosvári KA, Veres DS, Otrókoci L, Kittel Á, Ligeti E. Effect of storage on physical and functional properties of extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014; 3 (25465): 1-8.
- Maatallah M, Vading M, Kabir MH, Bakhrouf A, Kalin M, Naucclér P, Brisse S, Giske CG. *Klebsiella variicola* Is a Frequent Cause of Bloodstream Infection in the Stockholm Area, and Associated with Higher Mortality Compared to *K. pneumoniae*. *PLOS ONE*. 2014; 9 (11): 1-21.
- Maina D, Revathi G, Whitelaw AC. Molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* harbouring extended spectrum beta-

- lactamases and carbapenemases genes at a tertiary hospital, Kenya. *Microbiologia Medica*. 2017; 32 (7076): 132-137.
- Maroto R, Zhao Y, Jamaluddin M, Popov VL, Wang H, Kalubowilage M, Zhang Y, Luisi J, Sun H, Culbertson CT, Bossmann SH, Motamedi M, Brasier AR. Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2017; 6 (1359478): 1-18.
- Martora F, Pinto F, Folliero V, Cammarota M, Dell'Annunziata F, Squillaci G, Galdiero M, Morana A, Schiraldi C, Giovane A, Galdiero M, Franci G. Isolation, characterization and analysis of pro-inflammatory potential of *Klebsiella pneumoniae* outer membrane vesicles. *Microbial Pathogenesis*. 2019; 136 (103719): 1-6.
- Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Croom M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infectious Diseases*. 2013; 13: 785-796.
- Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Moore C. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022; 399: 629-655. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)02724-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)02724-0/fulltext)
- Nagakubo T, Nomura N, Toyofuku M. Cracking open bacterial membrane vesicles. *Frontiers in Microbiology*. 2020; 10 (3026): 1-9.
- Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017; 41 (3): 252-275.
- Nordmann P, Poirel L, Carrère A, Toleman MA, Walsh TR. How to Detect NDM-1 Producers. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 49 (2): 718-721.
- Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016; 80 (3): 629 – 661.

- Park SJ, Jeon H, Yoo S-M, Lee M-S. The effect of storage temperature on the biological activity of extracellular vesicles for the complement system. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 2018; 54: 423-429.
- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2011; 70: 119-123.
- Ramirez MS, Traglia GM, Lin DL, Tran T, Tolmasky ME. Plasmid-mediated antibiotic resistance and virulence in Gram-negatives: The *Klebsiella pneumonia* paradigm. *Microbiology Spectrum*. 2014; 2 (5): PLAS-0016-2013: 1-15.
- Rasheed JK, Anderson GJ, Yigit H, Queenan AM, Doménech-Sánchez A, Swenson JM, Biddle JW, Ferraro MJ, Jacoby GA, Tenover FC. Characterization of the Extended-Spectrum β -Lactamase Reference Strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), Which Produces the Novel Enzyme SHV-18. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2000; 44 (9): 2382-2388.
- Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Brisse S. Identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* and Related Phylogroups by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 9: 1-7.
- Roier S, Zingl FG, Cakar F, Schild S. Bacterial outer membrane vesicle biogenesis: a new mechanism and its implications. *Microbial Cell*. 2016; 3 (6): 257-259.
- Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC, Mosquera A, Chaves F, Bou G. Horizontal Transfer of the OXA-24 Carbapenemase Gene via Outer Membrane Vesicles: A New Mechanism of Dissemination of Carbapenem Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2011; 55 (7): 3084-3090.
- Sabaté M, Miró E, Navarro F, Vergés C, Aliaga R, Mirelis B, Prats G. β -Lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002; 49: 989-997.

- Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. 2001. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schulz E, Goes A, Garcia R, Panter F, Koch M, Müller R, Fuhrmann K, Fuhrmann G. Biocompatible bacteria-derived vesicles show inherent antimicrobial activity. *Journal of Controlled Release*. 2018; 290: 46-55.
- Schwechheimer C, Kuehn M. Outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature Reviews*. 2015; 13: 605-619.
- Shao H, Im H, Castro CM, Breakefield X, Weissleder R, Lee H. New technologies for analysis of extracellular vesicles. *Chemical Reviews*. 2018; 118: 1917-1950.
- Thakur A, Parra DC, Motalebnejad P, Brochhi M, Chen HJ. Exosomes: small vesicles with big roles in cancer, vaccine development and therapeutics. *Bioactive Materials*. 2022; 10: 281-294.
- Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach JM, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter AA, Bebawy M, Beckham C, Bedina Zavec A, Benmoussa A, Berardi AC, Bergese P, Bielska E, Blenkiron C, Bobis-Wozowicz S, Boilard E, Boireau W, Bongiovanni A, Borràs FE, Bosch S, Boulanger CM, Breakefield X, Breglio AM, Brennan MÁ, Brigstock DR, Brisson A, Broekman ML, Bromberg JF, Bryl-Górecka P, Buch S, Buck AH, Burger D, Busatto S, Buschmann D, Bussolati B, Buzás EI, Byrd JB, Camussi G, Carter DR, Caruso S, Chamley LW, Chang YT, Chen C, Chen S, Cheng L, Chin AR, Clayton A, Clerici SP, Cocks A, Cocucci E, Coffey RJ, Cordeiro-da-Silva A, Couch Y, Coumans FA, Coyle B, Crescitelli R, Criado MF, D'Souza-Schorey C, Das S, Datta Chaudhuri A, de Candia P, De Santana EF, De Wever O, Del Portillo HA, Demaret T, Deville S, Devitt A, Dhondt B, Di Vizio D, Dieterich LC, Dolo V, Dominguez Rubio AP, Dominici M, Dourado MR, Driedonks TA, Duarte FV, Duncan HM, Eichenberger RM, Ekström K, El Andaloussi S, Elie-Caille C, Erdbrügger U, Falcón-Pérez JM, Fatima F, Fish JE, Flores-Bellver M, Försonits A, Frelet-Barrand A, Fricke F, Fuhrmann G, Gabrielsson S, Gámez-Valero A, Gardiner C, Gärtner K, Gaudin R, Gho YS, Giebel B, Gilbert C, Gimona M, Giusti I, Goberdhan DC, Görgens A, Gorski SM, Greening DW, Gross JC, Gualerzi A,

Gupta GN, Gustafson D, Handberg A, Haraszti RA, Harrison P, Hegyesi H, Hendrix A, Hill AF, Hochberg FH, Hoffmann KF, Holder B, Holthofer H, Hosseinkhani B, Hu G, Huang Y, Huber V, Hunt S, Ibrahim AG, Ikezu T, Inal JM, Isin M, Ivanova A, Jackson HK, Jacobsen S, Jay SM, Jayachandran M, Jenster G, Jiang L, Johnson SM, Jones JC, Jong A, Jovanovic-Talisman T, Jung S, Kalluri R, Kano SI, Kaur S, Kawamura Y, Keller ET, Khamari D, Khomyakova E, Khvorova A, Kierulf P, Kim KP, Kislinger T, Klingeborn M, Klink DJ 2nd, Kornek M, Kosanović MM, Kovács ÁF, Krämer-Albers EM, Krasemann S, Krause M, Kurochkin IV, Kusuma GD, Kuypers S, Laitinen S, Langevin SM, Languino LR, Lannigan J, Lässer C, Laurent LC, Lavieu G, Lázaro-Ibáñez E, Le Lay S, Lee MS, Lee YXF, Lemos DS, Lenassi M, Leszczynska A, Li IT, Liao K, Libregts SF, Ligeti E, Lim R, Lim SK, Linē A, Linnemannstöns K, Llorente A, Lombard CA, Lorenowicz MJ, Lörincz ÁM, Lötvall J, Lovett J, Lowry MC, Loyer X, Lu Q, Lukomska B, Lunavat TR, Maas SL, Malhi H, Marcilla A, Mariani J, Mariscal J, Martens-Uzunova ES, Martin-Jaular L, Martinez MC, Martins VR, Mathieu M, Mathivanan S, Maugeri M, McGinnis LK, McVey MJ, Meckes DG Jr, Meehan KL, Mertens I, Minciacchi VR, Möller A, Møller Jørgensen M, Morales-Kastresana A, Morhayim J, Mullier F, Muraca M, Musante L, Mussack V, Muth DC, Myburgh KH, Najrana T, Nawaz M, Nazarenko I, Nejsun P, Neri C, Neri T, Nieuwland R, Nimrichter L, Nolan JP, Nolte-'t Hoen EN, Noren Hooten N, O'Driscoll L, O'Grady T, O'Loghlen A, Ochiya T, Olivier M, Ortiz A, Ortiz LA, Osteikoetxea X, Østergaard O, Ostrowski M, Park J, Pegtel DM, Peinado H, Perut F, Pfaffl MW, Phinney DG, Pieters BC, Pink RC, Pisetsky DS, Pogge von Strandmann E, Polakovicova I, Poon IK, Powell BH, Prada I, Pulliam L, Quesenberry P, Radeghieri A, Raffai RL, Raimondo S, Rak J, Ramirez MI, Raposo G, Rayyan MS, Regev-Rudzki N, Ricklefs FL, Robbins PD, Roberts DD, Rodrigues SC, Rohde E, Rome S, Rouschop KM, Ruggetti A, Russell AE, Saá P, Sahoo S, Salas-Huenuleo E, Sánchez C, Saugstad JA, Saul MJ, Schiffelers RM, Schneider R, Schøyen TH, Scott A, Shahaj E, Sharma S, Shatnyeva O, Shekari F, Shelke GV, Shetty AK, Shiba K, Siljander PR, Silva AM, Skowronek A, Snyder OL 2nd, Soares RP, Sódar BW, Soekmadji C, Sotillo J, Stahl PD, Stoorvogel W, Stott SL, Strasser EF, Swift S, Tahara H, Tewari M, Timms K, Tiwari S, Tixeira R, Tkach M, Toh WS, Tomasini R, Torrecilhas AC, Tosar JP, Toxavidis V, Urbanelli L, Vader P, van Balkom BW, van der Grein SG, Van Deun J, van Herwijnen MJ,

Van Keuren-Jensen K, van Niel G, van Royen ME, van Wijnen AJ, Vasconcelos MH, Vechetti IJ Jr, Veit TD, Vella LJ, Velot É, Verweij FJ, Vestad B, Viñas JL, Visnovitz T, Vukman KV, Wahlgren J, Watson DC, Wauben MH, Weaver A, Webber JP, Weber V, Wehman AM, Weiss DJ, Welsh JA, Wendt S, Wheelock AM, Wiener Z, Witte L, Wolfram J, Xagorari A, Xander P, Xu J, Yan X, Yáñez-Mó M, Yin H, Yuana Y, Zappulli V, Zarubova J, Žekas V, Zhang JY, Zhao Z, Zheng L, Zheutlin AR, Zickler AM, Zimmermann P, Zivkovic AM, Zocco D, Zuba-Surma EK. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2018; 7 (1535750): 1-43.

Tiwari V, Solanki V, Roy R, Biswas D, Tiwari M. Significances of OMV and Extracellular Vesicle Proteomics. *Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics*. 2017; 8 (1): 1-10.

Toyofuku M, Nomura N, Eberl L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews*. 2019; 17: 13-24.

Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvald J, Nolte-‘t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben MH, Hochberg F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicles research. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2013; 2 (20360): 1-25.

World Health Organization (WHO). Guidelines on Core Components of Infection Prevention and Control Programmes at the National and Acute Health Care Facility Level. 2016.

World Health Organization (WHO). Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide. 2011.

Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Current opinion in Microbiology*. 2018; 45: 131-139.

Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*. 2020; 18: 344-359.

- Yaron S, Kolling GL, Simon L, Matthews KR. Vesicle-Mediated Transfer of Virulence Genes from *Escherichia coli* O157:H7 to Other Enteric Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66 (10): 4414-4420.
- You HS, Kim MJ, Ok YJ, Lee EJ, Kang SS, Hyun SH. Characteristics of outer-membrane vesicles derived from *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883. *International Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research*. 2018; 4 (3A): 3171-3176.
- You HS, Ok YJ, Lee SH, Kang SS. Changes in Gene Expression in Human Epithelial and Mast Cell in Response to Vesicles from *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883. *Indian J Microbiol*. 2019; 59 (2): 241-245.

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.



Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 21 de agosto de 2020.

Of. CEP/PRP/Nº 078/2020

Prof. Dr. Marcelo Brocchi
Pesquisador Responsável

REF.: DISPENSA DE APRESENTAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA PARA AVALIAÇÃO DO SISTEMA CEP-CONEP.

Prezado Senhor,

Informamos que a pesquisa intitulada "Caracterização de vesículas da membrana externa produzidas por cepas de *Klebsiella pneumoniae*", para fins de projeto de pesquisa de mestrado no Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia, da aluna Diana Carolina Parra Chavez, sob a orientação do docente supracitado, destina-se em realizar a caracterização de OMVs produzidas por linhagens de *K. pneumoniae* resistentes a β -lactâmicos quanto ao conteúdo proteico e de mRNAs. Será também avaliado o potencial de OMVs em transferir genes codificadores de carbapenemases a outras bactérias e em interferir na atividade de antimicrobianos.

Deste modo, baseados no resumo anexado ao documento, as amostras serão obtidas por meio de linhagens celulares obtidas comercialmente, por isso não necessita tramitar pelo Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos.

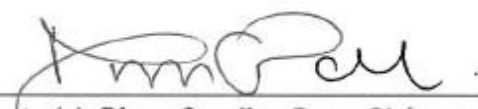
Atenciosamente,


Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP

Anexo 2. Declaração de Propriedade dos Direitos Autorais.**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Caracterização de vesículas da membrana externa (OMVs) produzidas por cepas de *Klebsiella pneumoniae***, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 19 de dezembro de 2022

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Diana Carolina Parra Chávez**
RG n.º F076756-C

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Marcelo Brocchi**
RG n.º 18425191-6