

Construcción de una filogenia molecular para las especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* basada en los genes *ARNr 16S* y *ARN polimerasa subunidad*

Construction of a molecular phylogeny for klebsiella and Raoultella SP based on rRNA 16S and RNA polimarase subunit genes

Nelson Enrique Arenas, MSc,¹ Andrés Julián Gutiérrez, Biol.,² Luz Mary Salazar, PhD,³ Juan Carlos Polanco, PhD,⁴ Arley Gómez, PhD⁵

Resumen

Las bacterias de los géneros *Raoultella* y *Klebsiella* son patógenos oportunistas para las cuales no existe un sistema uniforme de clasificación taxonómica internacional. En el presente estudio se propone una filogenia molecular basada en el gen ribosomal 16S (*ADNr 16S*) y el gen codificante de la subunidad de la ARN polimerasa (*rpoB*) de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* con el fin de establecer relaciones evolutivas entre dichos géneros. Los resultados evidencian una agrupación acorde con la taxonomía y las propiedades bioquímicas características, reportadas en el Genbank. Se estableció una bifurcación en los árboles, lo cual confirma la separación de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*. Adicionalmente, se confirmó el carácter polifilético de *K. aerogenes* por el gen *ADNr 16S* y la agrupación de *R. terrigena* y *K. oxytoca* de acuerdo con el gen *rpoB*.

La comparación entre los árboles obtenidos permitió determinar relaciones evolutivas entre las especies, a partir de los genes evaluados, lo cual refleja cambios aparentes a nivel taxonómico y corrobora la importancia del análisis a nivel de multilocus. Este tipo de estudios permite monitorear la estabilidad de los genotipos microbianos

sobre la escala temporal y espacial, mejorar la precisión de las anotaciones taxonómicas (mejor descripción de taxones o subdivisiones genéticas) y evaluar la diversidad genética y adaptabilidad en términos de virulencia o resistencia a drogas.

Palabras clave: *Klebsiella*, *Raoultella*, filogenia, taxonomía.

Recibido: mayo 28 de 2009

Aceptado: julio 1 de 2009

¹ Grupo de Investigación en Patogénesis Molecular (Patomol), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Quindío. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

² Grupo de Investigación en Bioprocesos y Bioprospección, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

³ Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

⁴ División de Genética Molecular y Biología del Desarrollo, Instituto de Biociencias Moleculares, Universidad de Queensland, Brisbane, Australia.

⁵ Grupo de Investigación en Patogénesis Molecular (Patomol), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

Correo electrónico: arley.gomez24@urosario.edu.co.

Summary

The bacteria belonging to *Raoultella* and *Klebsiella* genera are opportunistic pathogens for which there is no consensus about a unique internationally taxonomic system.

In this study, we suggest a molecular phylogeny based on 16S (*rDNA 16S*) ribosomal gene and the beta subunit RNA polymerase (*rpoB*) encoding gene of *Klebsiella* and *Raoultella* in order to set up evolutionary relationships among these genera.

Results showed a cluster with similar biochemical and taxonomy characteristics in agreement to Genbank description, and a tree bifurcation which confirms the *Klebsiella* and *Raoultella* genera separation. Moreover, we verified the polyphyletic character of *K. aerogenes*

by *rDNA 16S* and particularly the clustering for both *R. terrigena* and *K. oxytoca* based on *rpoB* gene.

The evolutionary relationships recognition was obtained by comparison among the corresponding trees for both genes unravelling significant changes at taxonomic level and stressing the importance of multilocus analysis approach.

These studies are useful for tracking the microbial genotype stability over time and space scale; as well as on improving taxonomic annotations (taxa descriptions and genetic subdivisions) and evaluation of genetic diversity in terms of virulence and drug resistance.

Key words: *Klebsiella*, *Raoultella*, phylogeny, taxonomy.

INTRODUCCIÓN

El género *Klebsiella* fue descrito en 1881 por Von Frisch, quien observó, por primera vez, estos bacilos encapsulados en muestras de pacientes con rinoscleroma. Este género fue llamado así por Trevisan en 1885, en honor al microbiólogo alemán Edwin Klebs (1834-1913) (1). Las bacterias del género *Klebsiella* son organismos saprófitos, las cuales pueden estar presentes como flora normal, principalmente en el tracto respiratorio; incluso algunos autores sugieren que las especies del género *Klebsiella* podrían tener una relación simbiótica y benigna con su hospedero (2). La capacidad de diseminación en las superficies mucosas del hospedero es mediada por su variabilidad genotípica y la diversidad en la expresión de factores de virulencia, los cuales pueden generar infección en diferentes sitios anatómicos y colonizar distintos nichos ecológicos. Estas bacterias persisten como

patógenos frecuentes de infecciones adquiridas en el ambiente hospitalario y en la comunidad (3) (Tabla 2).

El aumento en la frecuencia de infecciones y brotes nosocomiales causados por organismos del género *Klebsiella*, y descrita en diversos estudios clínicos, ha permitido identificar la circulación de variantes clonales y policlonales de cepas, cuya especie predominante es *K. pneumoniae* (4).

A pesar de los esfuerzos por generar un criterio unificado para la clasificación de estos bacilos, persiste una inconsistencia de base en la diferenciación a nivel de especie y subespecie. Actualmente, las especies de *Klebsiella* son diferenciadas según el grado de patogenicidad y el tipo de infección generado (Tabla 2) (5).

Tabla 1. Esquemas de clasificación propuestos para el género *Klebsiella* (*K*) y *Raoultella* (*R*) por diferentes sistemas taxonómicos

Cowan 1960	Bascomb 1971	Ørskov 1984	Taxonomía Actual (Genbank)
<i>K. aerogenes</i>	<i>K. aerogenes/ oxytoca/edwardsii</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. oxytoca</i>
<i>K. Edwardsii</i> subespecie edwardsiii subespecie atlantae	<i>K. pneumoniae</i> sensu stricto sensu lato	<i>K. pneumoniae</i> subsp. pneumoniae subsp. ozaenae subsp. rhinoscleromatis	<i>K. pneumoniae</i> subsp. pneumoniae subsp. ozaenae subsp. rhinoscleromatis
<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. terrigena</i>	<i>K. variicola</i>
<i>K. ozaenae</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. planticola</i> (Syn. Trevisanii)	<i>K. granulomatis</i> (previamente clasificado como <i>Calymmatobacterium granulomatis</i>)
<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. Unnamed group</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>K. ornithinolytica</i>	<i>K. milletis</i> <i>K. singaporensis</i> <i>K. senegalensis</i> <i>K. aerogenes</i> <i>K. alba</i> <i>R. terrigena, R. planticola, R. ornithinolytica</i>

Fuente: Adaptada de: Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1998;11(4):589-603.

Tabla 2. Principales especies patógenas de *Klebsiella*

Especie	Tipo de enfermedad
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	Neumonías e infecciones nosocomiales
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	Ocena
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	Rinoscleroma o escleroma nasal
<i>K. oxytoca</i>	Infecciones nosocomiales
<i>K. granulomatis</i>	Donovanosis

Según la clasificación del Genbank, actualmente se reconocen 9 especies en el género *Klebsiella*: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. granulomatis*, *K. variicola*, *K. aerogenes*, *K. senegalensis*, *K. singaporensis*, *K. milletis* y *K. alba* (6-7)

(Tabla 1), en su mayoría diferenciadas a partir de pruebas bioquímicas convencionales o con base en su identidad con el gen ribosomal 16S (*ADNr 16S*) y/o el gen codificante de la subunidad-β de la ARN polimerasa (*rpoB*).

K. alba es una especie ambiental conocida por su capacidad para crecer en zonas contaminadas con herbicidas (8).

K. variicola, un bacilo aislado inicialmente de plantas de plátano, caña de azúcar y maíz, se asemeja a *K. pneumoniae* a nivel de la secuencia de sus genes ribosomales y de las pruebas bioquímicas convencionales (9).

K. singaporensis presenta un 99,3% y 97,5% de similitud con los genes *ADNr 16S* y *rpoB* de *K. pneumoniae*; sin embargo, los estudios de hibridación del ADN evidenciaron una baja relación genética con el género *Klebsiella* (10).

En el caso de *K. senegalensis* y *K. milletis*, sólo se han establecido en el género *Klebsiella* con base en su similitud con el gen *ADNr 16S*.

Recientemente, tres especies ambientales (*Raoultella ornithinolytica*, *Raoultella planticola* y *Raoultella terrigena*) previamente consideradas como género *Klebsiella* han sido reclasificadas en el género *Raoultella* (11-12).

Actualmente no existe un consenso internacional para la clasificación de los géneros *Raoultella* y *Klebsiella*. En el Reino Unido se utiliza el sistema de Cowan (1960); en Estados Unidos y la mayoría de países europeos aplican el sistema de Ørskov (1984) (Tabla 1).

Los análisis filogenéticos basados en genes evolutivamente conservados han permitido establecer relaciones evolutivas entre estas especies, en los cuales se evidencia una alta heterogeneidad genotípica y el carácter polifilético de algunas especies en el género *Klebsiella* (13). Su impacto en la taxonomía de los géneros se evidencia en las distintas correcciones y reclasificaciones, especialmente de las especies ambientales potencialmente patógenas y en las patógenas oportunistas.

En el presente estudio se analizaron las posibles relaciones filogénicas entre las especies

actualmente anotadas en los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*, a partir de los genes *ADNr 16S* y *rpoB*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La selección de genes se realizó teniendo en cuenta los evolutivamente conservados, reportados en el Genbank como los genes *ADNr 16S* y *rpoB*, los cuales se caracterizan por presentar una tasa de evolución constante y baja durante largos periodos, con valores semejantes de identidad entre las distintas especies. Además, considerados genes de referencia para realizar anotaciones y reclasificaciones taxonómicas de nuevas especies (13).

Se realizó una búsqueda de secuencias de los genes previamente mencionados, con una identidad superior al 95%, a través de la herramienta BLASTn (14) para especies del género *Klebsiella* y *Raoultella*, excluyendo secuencias redundantes. Adicionalmente, en la búsqueda de secuencias y a través de la revisión de la taxonomía de los géneros correspondientes, se incluyeron especies como: *K. milletis*, *K. senegalensis*, *K. singaporensis* y *K. aerogenes*.

Las secuencias obtenidas en formato FASTA se alinearon en el programa ClustalW (<http://align.genome.jp/>) (15). Se empleó una matriz de puntaje única para ADN (IUB). Los alineamientos fueron exportados al programa MEGA (Versión 4.0) para la construcción de la filogenia molecular (16), utilizando el test Neighbor-Joining (NJ) (17) con el método *p-distance* con 1.000 repeticiones *bootstrap*, teniendo en cuenta transiciones y transversiones. La diversidad nucleotídica y la determinación del número de sitios polimórficos también fue realizada en MEGA (16).

Como grupos externos relacionados con las especies estudiadas se incluyeron las especies

Methanococcus aeolicus (Maeolicus) para el gen *ADNr 16S* y *Streptococcus equinus* (Sequinus) para el gen *rpoB*, las cuales corresponden a dos especies alejadas taxonómicamente a nivel de dominio y clase, respectivamente.

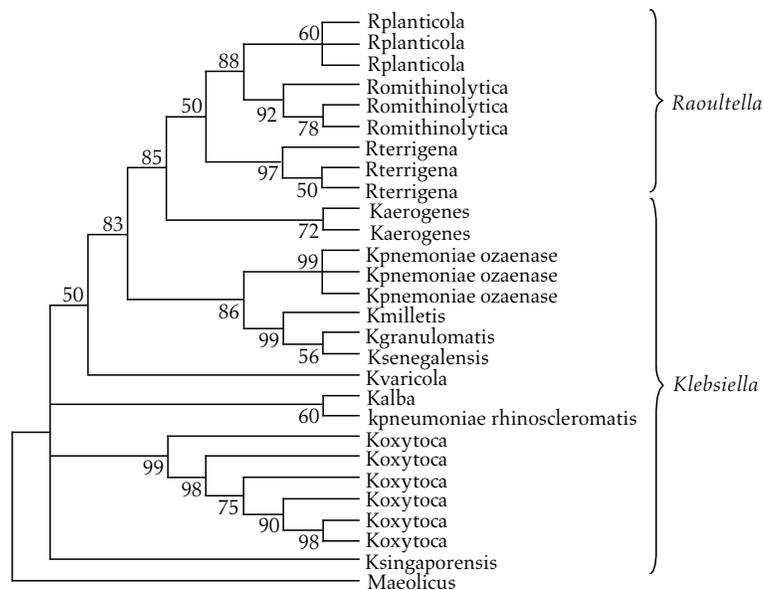
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la construcción del árbol filogenético basado en el gen *ADNr 16S*, se seleccionaron 28 secuencias de las 14 especies pertenecientes a los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*, las cuales

cumplían con el criterio de selección previamente establecido. Teniendo en cuenta el nivel de conservación de este gen para las especies estudiadas, se determinó una diversidad de 0,0412 y la presencia de 314 sitios polimórficos.

El árbol filogenético presentó una agrupación similar a la taxonomía establecida en el Genbank y permitió verificar la variabilidad en el gen *ADNr 16S*, lo cual justifica la separación de los dos géneros como linajes separados (Figura 1).

Figura 1. Árbol filogenético basado en el gen *ADNr 16S* para 28 taxones de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*. La construcción del árbol se empleó el método NJ (17) con 1.000 réplicas. Los valores *Bootstrap* son mostrados entre las ramas respectivamente. El árbol fue realizado en el programa MEGA 4.0 (16)



El género *Raoultella* presentó dos grupos: uno formado por *R. ornithinolytica* y *R. plan-tícola* y otro constituido por *R. terrigena*. Es importante resaltar el carácter polifilético de *K. aerogenes*, la cual se relacionó más filogenéticamente con las especies del género *Raoultella*;

motivo de controversia en torno a su posición sistemática (13).

Anteriormente, el nombre de *K. aerogenes* fue utilizado para referirse a las cepas de *K. pneumoniae*; sin embargo, actualmente se considera que *Enterobacter aerogenes* debe ser

transferido al género *Klebsiella* con el nombre de *K. mobilis* o *K. aerogenes*.

En cuanto a las especies de *Klebsiella*, se observó un grupo, constituido por: *K. pneumoniae*, *K. milletis*, *K. granulomatis*, *K. senegalensis* y *K. variicola*; un segundo grupo por *K. alba* con *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* y en un tercer grupo correspondiente a *K. oxytoca*. Finalmente, *K. singaporensis* aparece como la especie más ancestral y alejada filogenéticamente al género *Klebsiella*, de acuerdo con las distancias de las ramas (Figura 1). De las tres subespecies de *K. pneumoniae*, se observó un patrón de agrupamiento diferente en *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* que podría asociarse a la existencia un mayor polimorfismo en relación a las demás subespecies.

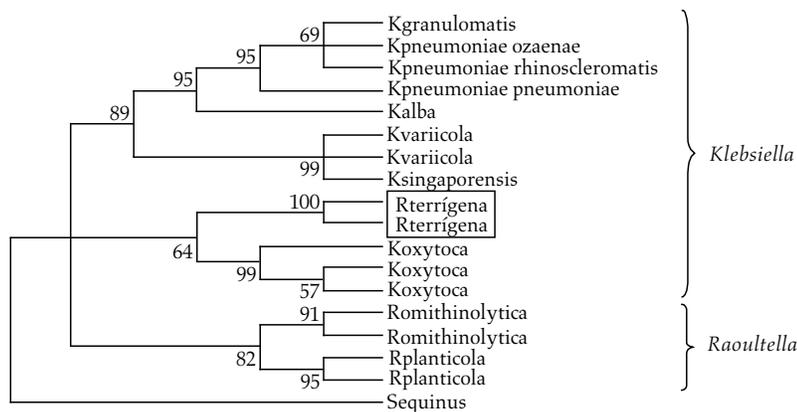
Los genes *ADNr 16S* y *rpoB* son marcadores moleculares de referencia universal para genotipificación bacteriana. Por dicha razón,

este segundo gen fue incluido en este estudio. Incluso se ha reportado el mayor poder discriminatorio del gen *rpoB*, de gran utilidad en la identificación bacterias entéricas, dada la mayor tasa de mutación neutral, en comparación con el gen *ADNr 16S* (18-19).

Con base en el análisis de 18 secuencias del gen *rpoB*, se encontró una mayor diversidad (0,07523) y se detectaron únicamente 189 sitios polimórficos, en comparación con el gen *ADNr 16S*. Estos genes presentaron una alta identidad ($\geq 95\%$) en todas las especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*; sin embargo, no se encontraron las secuencias del gen *rpoB* correspondientes para *K. senegalensis* y *K. milletis*.

El género *Raoultella* formó un grupo único con *R. ornithinolytica* y *R. planticola*, pero *R. terrigena* mostró mayor relación filogenética con *K. oxytoca* que con las dos especies previamente mencionadas del mismo género (Figura 2).

Figura 2. Árbol filogenético basado en el gen *rpoB* para 18 taxones de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*. La historia evolutiva fue inferida mediante el método NJ (17). Se presenta el árbol óptimo con los respectivos valores *Bootstrap* (1.000 réplicas) entre las ramas. La relación filogenética de *R. planticola* con *K. oxytoca* se indicada en un cuadro. La construcción del árbol se realizó en el programa MEGA 4.0 (16)



Adicionalmente, para las especies del género *Klebsiella* se observaron dos grupos: uno que incluye tres subespecies de *K. pneumoniae*, *K. granulomatis* y *K. alba*; y un segundo grupo con *K. variicola* y *K. singaporensis*. En consenso con la taxonomía establecida para las especies del género *Klebsiella*, se observó un patrón de agrupamiento coincidente con las reclasificaciones y enmendaciones de las especies estudiadas con el gen *rpoB*; una evidencia sólida es la relación estrecha de *K. granulomatis* con *K. pneumoniae*.

Para los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*, el análisis genético a nivel de especie puede proveer indicios acerca de la variabilidad dentro de una población bacteriana y generar evidencias acerca de la plasticidad y evolución de su genoma, conduciendo a la adaptación bacteriana bajo distintas condiciones ambientales. Del mismo modo, el análisis de polimorfismos o variaciones específicas en genes evolutivamente conservados, como el *ADNr 16S* y *rpoB*, permite determinar diferencias en organismos a nivel de especie o subespecie, la cual puede ser aplicada en el área clínica para discriminar brotes de un agente infeccioso determinado (20).

La mayoría de las especies de *Klebsiella* presentan un complejo amplio de variaciones clonales que se caracterizan por su alta similitud u homología a nivel genómico. Adicionalmente, se conoce poco acerca de la tasa de variación de algunos genes constitutivos, ya sea por la inducción de mutaciones sinónimas o no sinónimas, y/o por intercambio de material genético, por lo cual se desconoce la tasa real de recombinación en el genoma de muchos organismos.

Otra aplicación del análisis de secuencias de múltiples genes constitutivos es el impacto en la historia filogenética de las especies bacterianas y la inferencia de la estructura poblacional, lo cual puede explicar la expansión y diversificación dentro de linajes específicos.

En conclusión, este estudio permitió identificar la posición taxonómica de las especies clasificadas y corregidas en los géneros *Klebsiella* y *Raoultella*, de acuerdo con el análisis comparativo de los genes *ADNr 16S* y *rpoB*, entre los cuales ha existido controversia y desacuerdo en la adopción de una nomenclatura universal entre laboratorios, e incluso sistemas de clasificación que se tienen de referencia a nivel diagnóstico.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue desarrollado en el marco del proyecto: "Translocación bacteriana e infección postoperatoria en pacientes con trauma abdominal" financiado por el Fondo de Investigación de la Universidad del Rosario (FIUR).

REFERENCIAS

1. Martínez J, Martínez L, Rosenblueth M, Silva J, Martínez-Romero E. How are gene sequence analysis modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. *Int Microbiol.* 2004;7:261-68.
2. Struve C, Krogfelt KA. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Environ Microbiol.* 2004;6:584-90.

3. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol. Rev. 1998;11(4):589-603.
4. Podschun R, Pietsch S, Höller C, Ullman U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. Appl. Environ Microbiol. 2001;67:3325-27.
5. 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. Int. J. Syst Evol Microbiol. 2001;51:915-24.
6. Granier SA, Plaisance L, Leflon-Guibout V, Lagier E, Morand S, Goldstein FW, Nicolas-Chanoine MH. Recognition of two genetic groups in *Klebsiella oxytoca* taxon on the basis of the chromosomal β -lactamase and housekeeping gene sequences as well as ERIC-1R PCR typing. Int. J. Syst Evol Microbiol. 2003;53:661-68.
7. Carter JS, Bowden FJ, Bastian I, Myers GM, Sriprakash KS, Kemp DJ. Phylogenetic evidence for reclassification of *Calymmatobacterium granulomatis* as *Klebsiella granulomatis* comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 1999;49:1695-700.
8. Yu Z, Jing D, Ren L. *Klebsiella alba* sp. nov., a new atrazine and dursban tolerant bacterium isolated from heavily polluted environment. Unpublished (as of 27 November 2007).
9. Rosenblueth M, Martínez L, Silva J, Martínez-Romero E. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. Syst Appl Microbiol. 2004;27(1):27-35.
10. XianZhen L, DaoHai Z, Feng C, Jie M, YiHu D, LianHui Z. *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium. Int. J Syst Bacteriol. 2004;54(6):2131-6.
11. Bagley ST, Seidler RJ, Brenner DJ. *Klebsiella planticola* sp. nov.: a new species of *Enterobacteriaceae* found primarily in nonclinical environments. Curr Microbiol. 1981;6:105-9.
12. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51:925-32.
13. Boye K, Hansen D. Sequencing of 16s rDNA of *Klebsiella*: taxonomic relations within the genus and to other enterobacteriaceae. Int J Med Microbiol. 2003;292:495-503.
14. Stephen AF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997;25:3389-402.
15. Chenna R, Sugawara H, Koike T, López R, Gibson TJ, Higgins DG, et al. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acids Res. 2003;31(13):3497-500.
16. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol. 2007;24(8):1596-9.
17. Saitou N & Nei M The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 1987;4:406-25.
18. Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Bacteriol. 1994;44:846-49.
19. Mollet, C, Drancourt M, Didier R. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. Mol Microbiol. 1997;26:1005-11.
20. Tibayrenc M. Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms. Annu. Rev Microbiol. 1996;50:401-29.