

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Caracterização fenotípica e molecular de cepas de
***Klebsiella pneumoniae* obtidas de amostras clínicas.**

Regina Mariuza Borsato Quesada

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Prof.^a. Dr.^a. Marina Baquerizo Martinez

São Paulo
2003

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Caracterização fenotípica e molecular de cepas de
***Klebsiella pneumoniae* obtidas de amostras clínicas.**

Regina Mariuza Borsato Quesada

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^ª. Dr^ª. Marina Baquerizo Martinez

São Paulo
2003

17806

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005803

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Q5c Quesada, Regina Mariuza Borsato
Caracterização fenotípica e molecular de cepas e *Klebsiella pneumoniae* obtidas de amostras clínicas / Regina Mariuza Borsato Quesada. -- São Paulo, 2003.
140p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Curso de Mestrado Interinstitucional com a Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Martinez, Marina Barquerizo

I. Microbiologia clínica 2. Infecção hospitalar I. T. II. Martinez, Marina Barquerizo, orientador.

616.0756 CDD

Regina Mariuza Borsato Quesada

Caracterização fenotípica e molecular de cepas de
Klebsiella pneumoniae obtidas de amostras clínicas.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dr^a. Marina Baquerizo Martinez
Orientadora/presidente

Prof^a. Dr^a. Beatriz Ernestina Cabilio Guth
1^a. examinadora

Prof^a. Dr^a. Halha Ostrenskys Saridakis
2^a. examinadora

São Paulo, 22 de Outubro de 2003.

“O Senhor é meu pastor e nada me faltará”

(Salmo 22)

DEDICATÓRIA

**Ao meu esposo WILSON,
por todo o carinho, compreensão
e respeito pelo meu trabalho.**

**Aos meus filhos
TIAGO e ROSSANA,
ao meu genro GUSTAVO,
pela ternura que me dedicam,
por todo o apoio que me oferecem,
por entenderem as minhas ausências
e a minha falta de atenção durante este período.**

DEDICATÓRIA ESPECIAL

**Ao meu neto GABRIEL,
anjo enviado por Deus para alegrar
e completar a minha vida.**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À DEUS,

meu Caminho, minha Verdade e minha Vida.

À MARIA,

intercessora incansável junto a JESUS

para desatar os nós de minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

**Aos meus pais OZANA E HENRIQUE BORSATO,
por terem me ensinado o caminho do bem, da perseverança
e do trabalho. Requisitos necessários para superar obstáculos e
vencer os desafios.**

**À IVANIR DE LOURDES SANTOS SOUZA,
pela dedicação, cooperação, carinho e conforto
oferecidos a mim e à minha família ao longo destes anos.**

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a **Marina Baquerizo Martinez**, pela orientação e experiência profissional transmitida, pelo carinho, amizade e compreensão dedicados a mim e ao meu trabalho.

À Prof^a. Dr^a **Marilda Carlos Vidotto**, pela co-orientação, pela competência científica, por ter permitido realizar minhas pesquisas em seu laboratório e pela amizade demonstrada durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Aos docentes e amigos da disciplina de Microbiologia Clínica: **Alair A. Berbert, Floristher E. Carrara, Márcia R. E. Perugini, Marsileni Pelisson e Vera Lúcia C. Abbondanza**, que não mediram esforços para que minha capacitação pudesse ser efetivada, colocando em prática o verdadeiro sentido do trabalho em equipe. Minha eterna gratidão.

À Prof^a. Dr^a. **Primavera Borelli** e à Prof^a **Edna Maria V. Reiche**, incansáveis lutadoras para que o MINTER deixasse de ser um sonho e se tornasse realidade. Meus agradecimentos especiais.

À Prof^a **Leda Mezzaroba**, chefe do Departamento PALD, pela amizade, competência e constante preocupação em oferecer condições para o perfeito desenvolvimento do MINTER e para nossa capacitação.

Ao Prof. **Edson Lopes Lavado**, pela preciosa contribuição na análise estatística deste estudo.

À Prof^a. Dr^a. **Jacinta Sanches Pelayo**, pela disponibilidade, por partilhar seus conhecimentos e pela amizade ao longo desses anos.

À **Ana Maria Dias Dantas**, secretária do MINTER na Universidade de São Paulo e **Marina de Campos**, secretária do PALD na Universidade Estadual de Londrina, por toda competência e colaboração administrativa.

À amiga **Marsileni Pelisson**, que com seu apoio, estímulo, amizade e preciosos conhecimentos, contribuiu de maneira decisiva para a realização deste trabalho.

Ao amigo **Emerson Danguy Cavassin**, pelo companheirismo, cooperação e inestimável ajuda, sem a qual este trabalho não teria sido realizado.

Aos amigos do MINTER: **Alessandra, Egídio, Emerson, Helena, Ingridit, Jair, Maria Emília, Sandra e Sirley**, pela partilha, companheirismo, colaboração, amizade, alegria e pelos momentos de descontração que tanto ajudaram a dissipar as preocupações.

Às amigas **Alessandra Miyuki Akino, Maria Emília Fávero e Sandra Regina Quintal Carvalho**, pela ajuda prestimosa, amizade e apoio nos momentos difíceis.

Aos amigos servidores do Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná: **Clarice, Claudinéia, Cleudinei, Fabio, Emílio, Gerusa, Ivone, Marcelo, Marizia e Maura**, por toda a ajuda técnica e espírito de cooperação demonstrado ao longo desses anos de convivência.

Aos acadêmicos de Farmácia-Bioquímica **Renata Kanayama Pires e Fernando Rodrigues de Melo**, pelo carinho, amizade, respeito e por toda a ajuda técnica nas diversas etapas desta pesquisa.

À acadêmica de Biomedicina **Geizecler Tomazetto**, pela amizade e pelo apoio técnico dispensado na realização dos experimentos.

À mestrandia, **Ana Carolina Moreno**, da Universidade de São Paulo, pelo desprendimento, gentileza e colaboração.

Às amigas, mestrandas e doutorandas do Laboratório de Biologia Molecular: **Dorismey K. Tokano, Elizabete R. M. Marana, Eliana C. Vespero, Flora S. Kano, Iliana Alcocer, Márcia Shimada e Renata K. T. Kobayashi**, pelo companheirismo, pela amizade, pelos estímulos constantes e pelo verdadeiro significado da colaboração em pesquisa.

Às servidoras do Setor de Reagentes do Laboratório de Análises Clínicas do HURNP: **Alice, Marilene e Tereza**, pela amizade e valorosa contribuição na confecção de meios e reagentes necessários à minha pesquisa.

Aos estagiários do Laboratório de Biologia Molecular: **Alexandre, Francielle, Kleber, Marisa e Natasha**, pelo respeito, amizade e colaboração.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho, meus agradecimentos.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná, do Centro de Ciências da Saúde e no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE SÍMBOLOS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. SUSCETIBILIDADE DE <i>K.PNEUMONIAE</i> AOS ANTIMICROBIANOS.....	6
1.1.1. PRODUÇÃO DE ENZIMAS BETA-LACTAMASES	7
1.1.2. ENZIMAS ESBL.....	8
1.2. ANTÍGENOS CAPSULARES	10
1.3. AQUISIÇÃO DE FERRO –PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS	12
1.4. ADESINAS, <i>PILI</i> OU FÍMBRIAS	14
1.4.1. <i>PILUS</i> OU FÍMBRIA TIPO 1	15
1.4.2. FÍMBRIA TIPO 3.....	16
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 AMOSTRAS BACTERIANAS	19
3.1.1.AMOSTRAS HOSPITALARES INFECCIOSAS (Hi).....	19
3.1.2. AMOSTRAS HOSPITALARES COLONIZANTES (Hc).....	21
3.1.3. AMOSTRAS COMUNITÁRIAS (Co)	22
3.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	23
3.2.1. CULTIVO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS.....	25
3.2.2. ESTOCAGEM DAS AMOSTRAS	26
3.3 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE, <i>IN VITRO</i> , DE <i>K.PNEUMONIAE</i> AOS ANTIMICROBIANOS	26
3.3.1. DISCO DIFUSÃO	27

3.3.1.1. TRIAGEM DE CEPAS PRODUTORAS DE ESBL	28
3.3.2. MICRODILUIÇÃO	28
3.3.3. MÉTODO DO ETEST®	29
3.3.4. CONTROLE DE QUALIDADE DOS TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	30
3.4. DETECÇÃO FENOTÍPICA DA PRODUÇÃO DE ESBL.....	30
3.4.1. TESTE DA DUPLA DIFUSÃO EM DISCO (DDS).....	30
3.4.2. MÉTODO DA COMBINAÇÃO DE DISCOS (MCD).....	32
3.4.3. MÉTODO FENOTÍPICO CONFIRMATÓRIO DA PRODUÇÃO DE ESBL (ETEST®).....	33
3.5. CARACTERIZAÇÃO DE PLASMÍDIOS ISOLADOS DE <i>K.PNEUMONIAE</i>	34
3.5.1. CEPAS REFERENCIAIS DE PLASMÍDIOS	35
3.6. PESQUISA DE SEQUÊNCIAS GÊNICAS RELACIONADAS À RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E A FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>K.PNEUMONIAE</i> , POR REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE (PCR).....	36
3.6.1. EXTRAÇÃO DO DNA PARA PCR	37
3.6.2. REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA	38
3.6.3. CEPAS PADRÃO PARA PCR	39
3.6.4. ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS NA PCR.....	40
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4. RESULTADOS	42
4.1. CASUÍSTICA	42
4.2. CARACTERIZAÇÃO COLONIAL E BIOQUÍMICA	42
4.3. AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DOS ISOLADOS DE <i>K.PNEUMONIAE</i> AOS ANTIMICROBIANOS.....	45
4.3.1. MÉTODO DE DISCO DIFUSÃO	45
4.3.2. MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO	47
4.3.3. AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS ESBL.....	47
4.3.3.1. TESTE DA DUPLA DIFUSÃO EM DISCO (DDS).....	47
4.3.3.2. MÉTODO DA COMPARAÇÃO DE DISCOS (MCD).....	48
4.3.3.3. DETECÇÃO DE ESBL COM ETEST®	50
4.4. PADRÃO DE RESISTÊNCIA PARA AMINOGLICOSÍDEOS E SULFA ENTRE OS	

ISOLADOS DE <i>K.PNEUMONIAE</i> PRODUTORES DE ESBL.....	52
4.5. ANÁLISE MOLECULAR DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS ESBL.....	53
4.5.1. ASSOCIAÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE TIPOS DE ESBL ENTRE OS ISOLADOS HOSPITALARES DE <i>K.PNEUMONIAE</i>	54
4.6 CARACTERIZAÇÃO DE PLASMÍDIOS	56
4.7. FATORES DE VIRULÊNCIA	59
4.7.1. DETERMINAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS <i>IUTA</i>	59
4.7.2. DETERMINAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS <i>FIM</i> A E <i>FIM</i> H.....	60
4.7.3. DETERMINAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS <i>MRKA</i> E <i>MRKD</i>	60
4.7.4. DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA GÊNICA <i>KPSII</i>	61
4.8. ASSOCIAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA ENTRE ISOLADOS DE <i>K.PNEUMONIAE</i>	61
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÃO	79
7. APÊNDICE	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
9. ANEXOS	103

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Esquema para a disposição dos discos de antimicrobianos no teste de dupla difusão (DDS). 31
- Figura 2 Produção de enzima beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) pelo método DDS. 32
- Figura 3 Demonstração da produção de enzimas ESBL pelo método de comparação de discos. 33
- Figura 4 Perfil de sensibilidade demonstrados pelos isolados Hi, Hc e Co, frente aos antimicrobianos aminoglicosídeos, beta-Lactâmicos, quinolonas e sulfametoxazol/trimetoprim. 46
- Figura 5 Produção de ESBL demonstrada pelo método Etest®. 51
- Figura 6 Percentual de ESBL positivo para os isolados dos grupos Hi e Hc, com base nos testes DDS e MCD. 52
- Figura 7 Percentual de resistência frente aos aminoglicosídeos e sulfametoxazol/ trimetoprim, observado entre os isolados Hi e Hc produtores de ESBL. 53
- Figura 8 Figura representativa do perfil plasmidial de amostras Hi obtidas de isolados de *K.pneumoniae*, provenientes de diferentes materiais clínicos. 56
- Figura 9 Figura representativa do perfil plasmidial de amostras Hc obtidas de isolados de *K.pneumoniae*, provenientes de diferentes materiais clínicos. 57
- Figura 10 Figura representativa do perfil plasmidial de amostras Co obtidas de isolados de *K.pneumoniae*, provenientes de fezes de indivíduos saudáveis. 58

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Discriminação e origem dos isolados clínicos que compõem 20 o grupo de amostras hospitalares infecciosas (Hi), bem como o ano em que tais amostras foram obtidas.
- Tabela 2 Discriminação e origem dos isolados clínicos que compõem 22 o grupo de amostras Hospitalares colonizantes (Hc), bem como o ano em que tais amostras foram obtidas.
- Tabela 3 Discriminação e origem dos isolados clínicos que compõem 24 o grupo de amostras Comunitárias (Co), bem como o ano em que tais amostras foram obtidas.
- Tabela 4 Comparação dos pontos de corte de sensibilidade 28 recomendados para antimicrobianos de uso clínico em Enterobacteriaceae que servem de referência para detecção presuntiva de ESBL.
- Tabela 5 Relação dos plasmídios referenciais utilizados no método 36 de KADO e LIU (1981) modificado.
- Tabela 6 Seqüências de oligonucleotídeos, tamanho do fragmento 37 amplificado (pb) e temperatura de hibridização, utilizados para estudo dos fatores de resistência e virulência de *K.pneumoniae*, pela técnica de PCR.
- Tabela 7 Cepas padrão de bactérias utilizadas para os diferentes 39 marcadores de PCR.
- Tabela 8 Principais biotipos apresentados pelos isolados de 44 *K.pneumoniae* frente aos substratos investigados.
- Tabela 9 Distribuição dos principais biotipos apresentados pelos 45 isolados de *K.pneumoniae* dos grupos Hi, Hc e Co investigados.
- Tabela 10 Comparação entre os diâmetros dos halos de inibição 49 apresentados por ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX) isoladamente e em associação com ácido clavulânico (AC) frente aos isolados Hi.

- Tabela 11 Comparação entre os diâmetros dos halos de inibição 50 apresentados por ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX) isoladamente e em associação com ácido clavulânico (AC) frente aos isolados Hc.
- Tabela 12 Ocorrência de seqüências gênicas que codificam beta- 54 lactamases de espectro estendido (ESBL) dos tipos TEM, SHV e CTX-M, em isolados de *K.pneumoniae*, dos grupos Hi e Hc.
- Tabela 13 Associação das seqüências gênicas que codificam ESBL 55 dos tipos TEM, SHV e CTX-M, entre os isolados de *K.pneumoniae* dos grupos Hi e Hc.
- Tabela 14 Ocorrência de seqüências gênicas relacionadas aos fatores 59 de virulência entre isolados de *K.pneumoniae*, dos grupos Hi, Hc e Co.
- Tabela 15 Associação entre fatores de virulência apresentados pelos 62 isolados de *K.pneumoniae*, oriundos dos grupos Hi, Hc e Co, pela análise da PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Ácido clavulânico
AMC	Amoxicilina associada ao ácido clavulânico
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAZ	Ceftazidima
CAZ/AC	Ceftazidima associada ao ácido clavulânico
CCIH	Comissão de controle de infecção hospitalar
CDC	<i>Center for Disease Control and Epidemiology</i>
CFL	Cefalotina
CFR	Ceftriaxona
CFU	Cefuroxima
CFZ	Cefazolina
CIM	Concentração inibitória mínima
CPM	Cefepime
CTX	Cefotaxima
CTX/AC	Cefotaxima associada ao ácido clavulânico
CTX-M	Beta-lactamase do tipo Ceftaximase
DDS	<i>Double-disc synergism</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESBL	<i>Extended-spectrum beta-lactamase</i>
FimA	pilina da fímbria tipo 1
FimH	adesina da fímbria tipo 1
GEN	Gentamicina
HURNP	Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná
IPM	Imipenem
kb	Kilobases

kDa	Kilodalton
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LB	Meio Luria-Bertani
M	Molar
mA	Miliampere
MCA	MacConkey Agar
MCD	Método de comparação de discos
MDa	Megadalton
mg	Miligrama
MHA	Mueller-Hinton Agar
MHB	<i>Mueller-Hinton Broth</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MIC	<i>Minimal Inibitory Concentration</i>
min.	Minutos
MrkA	Pilina da fimbria tipo 3
MrkD	Adesina da fimbria tipo 3
MYSTIC	<i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection</i>
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standard</i>
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i>
ONPG	orto-nitro-piranogalactosídeo
pb	Pares de base
PBS	Tampão salina-fosfato
pcM	Picomolar
PCR	<i>Protein Chain Reaction</i>
PSC	Pronto Socorro Cirúrgico
PSM	Pronto Socorro Médico
PSO	Pronto Socorro Obstétrico
PSOr	Pronto Socorro Ortopédico
RN	Recém-nascido
rpm	Rotação por minuto
seg.	Segundos

SDS	Dodecil sulfonato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SHV	Beta-lactamase do tipo SHV
SMCIH	Serviço microbiológico de controle de infecção hospitalar
SXT	Sulfametoxazol/ trimetoprim
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TEM	Beta-lactamase do tipo TEM
TSA	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
U	Unidade
UBS	Unidade Básica de Saúde
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTI-Neo	Unidade Neonatal de Terapia Intensiva
UTI-Ped	Unidade Pediátrica de Terapia Intensiva
V	Volts
VP	Reação de Voges-Proskauer
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
X ²	<i>Qui</i> quadrado

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramma
Kb	Kilobases
Kg	Kilograma
M	Molar
mA	Miliampére
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
min.	Minutos
pb	Pares de base
pcM	Picomolar
rpm	Rotação por minuto
seg.	segundos
U	Unidade
V	Volts
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro
χ^2	<i>Qui</i> quadrado

RESUMO

Klebsiella pneumoniae, na condição de patógeno oportunista, causa infecções principalmente em recém-nascidos, idosos e pacientes imunocomprometidos por doenças crônicas como diabetes, etilismo, neoplasias, e tem exercido papel relevante nas infecções hospitalares. Pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva e os submetidos a procedimentos invasivos ou à terapia com antimicrobianos beta-lactâmicos, estão mais predispostos a processos infecciosos por *K.pneumoniae*. Os tratos urinário e respiratório são mais acometidos por este microrganismo, embora presente, com frequência, infecções relacionadas ao uso de cateter e sepses. Com o objetivo de caracterizar, fenotípica e molecularmente, 75 isolados de *K.pneumoniae* obtidos de diferentes materiais clínicos, foram analisados quanto ao perfil de suscetibilidade e produção de ESBL, bem como quanto à presença de fatores de virulência. Para tanto, foram estudados 25 isolados provenientes de pacientes hospitalizados portadores de infecções, 25 isolados de pacientes internados e colonizados por *K.pneumoniae*, 25 isolados procedentes de indivíduos saudáveis da comunidade extra-hospitalar. Entre os isolados hospitalares observou-se a produção de *K.pneumoniae* predominantemente com fenótipo mucóide, embora o gene *kpsII*, que codifica para cápsula do sorotipo K2 de *Klebsiella*, tenha sido encontrado em 8% desses isolados e em nenhuma amostra da comunidade. As cepas de *K.pneumoniae* investigadas, apresentaram elevada prevalência de ESBL (72%) entre os isolados hospitalares. A totalidade dos isolados comunitários mostrou perfil de sensibilidade acentuado e nenhuma produção de ESBL. As seqüências gênicas *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} foram predominantes entre os produtores de ESBL. Os genes *fimA* e *fimH*, que codificam fimbria tipo 1, tiveram distribuição equitativa (60%, 52% e 48%, respectivamente), entre os grupos, enquanto que os isolados de *K.pneumoniae* obtidos de infecção, mostraram maior prevalência do gene *iutA*, codificador do receptor para aerobactina. Da mesma forma, os genes *mrkA* e *mrkD*, que codificam para pilina e adesina da fimbria tipo 3 de *Klebsiella*, respectivamente, foram observados em maior prevalência entre os isolados hospitalares (84%). Conclui-se que isolados infecciosos de *K.pneumoniae* apresentaram maior número de genes envolvidos na patogenicidade, sugerindo que este microrganismo está capacitado a romper as barreiras naturais de defesa do hospedeiro.

ABSTRACT

Klebsiella is well known to most clinicians as a cause of community-acquired bacterial pneumonia, occurring particularly in chronic alcoholics. The majority of *Klebsiella* infections, however, are nosocomial. As opportunistic pathogens, *Klebsiella* ssp. primarily affect immunocompromised individuals who are hospitalized and suffer from severe underlying diseases such as diabetes mellitus or chronic pulmonary obstruction. Nosocomial *Klebsiella* infections are largely caused by *K.pneumoniae*. The urinary tract is the most common site of infections. *Klebsiella* is the second cause of nosocomial Gram-negative bacteremia. In pediatric wards, nosocomial *Klebsiella* infections are especially troublesome, particularly in premature infants and intensive care unit patients. The aim of this study was to investigate the antibiotic-resistant strains, extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing strains, and virulence genes among 75 strains of *K.pneumoniae* isolated from nosocomial infections (25), hospitalized patients without infections (25), and from community carriers outside of the hospital (25). Among the *K.pneumoniae* isolates obtained in the hospital there was a predominance of strains with a mucoid phenotype, even though the *kpsII* gene, which codes for the capsule found in the K2 *Klebsiella* serotype, was found only in 8% of these isolates, and in none of the samples obtained in the community. The *K.pneumoniae* nosocomial strains studied presented a high prevalence of ESBL production (72%). All of the community obtained isolates presented a highly susceptible profile and none produces ESBL. Among ESBL producing strains, the *bla*_{TEM} and the *bla*_{CTX-M} genes were predominant. The *fimA* and *fimH* genes, that code for type 1 fimbriae showed an equitative distribution between the groups, however, the nosocomial *K.pneumoniae* isolates presented a greater prevalence of the *iutA* gene, which codes for the aerobactin receptor. Likewise, the *mrkA* and *mrkD* genes that code for the type 3 *Klebsiella* fimbriae pilin and adhesin, respectively, were observed with a higher prevalence among nosocomial isolates. It can be concluded that *K.pneumoniae* clinical infection isolates present a higher number of genes involved in pathogenicity, which suggests that this kind of isolate is able to break the natural defense barriers of the host organism.

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram-negativo com relevância crescente nas infecções hospitalares e na condição de patógeno oportunista, freqüentemente causa infecções em pacientes imunocomprometidos. Neste sentido, as populações de maior risco incluem os recém-nascidos (RN), pacientes cirúrgicos, portadores de neoplasias e diabetes. Surtos hospitalares provocados por organismos multiresistentes a antibióticos, como cepas de *K.pneumoniae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (*extended-spectrum beta-lactamases* - ESBL), têm sido relatados em diversos países nos últimos anos. Sua importância se traduz, principalmente, pelas limitações terapêuticas apresentadas e pelo significativo impacto na prática clínica, por esses microrganismos estarem relacionados a altas taxas de morbidade, mortalidade e tratamento hospitalar oneroso.

O gênero *Klebsiella* é membro da família Enterobacteriaceae no qual as espécies *K.planticola*, *K.terrigena* e *K.ornithinolytica* (ABBOTT, 1999), são raramente obtidas de amostras humanas e, por terem sido isoladas preferencialmente do ambiente, são consideradas espécies ambientais (PODSCHUN et al, 2001). No entanto, as espécies *K.oxytoca* e *K.pneumoniae*, incluindo as subespécies *pneumoniae*, *rhinoscleromatis* e *ozaenae*, são freqüentemente isoladas de materiais biológicos humanos (ABBOTT, 1999; FARMER III, 1999; KONEMAN et al, 2001).

Amostras de *Klebsiella* desenvolvem-se na maioria dos meios de cultivo rotineiramente utilizados para diagnóstico laboratorial e, quando inoculadas em meios sólidos, apresentam-se como colônias grandes e úmidas com aspecto mucóide, por serem bactérias habitualmente capsuladas. Em ágar MacConkey as colônias adquirem coloração róseo-

avermelhada com difusão do pigmento para o ágar em consequência da fermentação da lactose (KONEMAN et al, 2001).

Na coloração de Gram, *Klebsiella* apresenta-se morfológicamente como bacilos ou cocobacilos Gram-negativos isolados. Este gênero compartilha com os demais membros da família Enterobacteriaceae características comuns, tais como: serem anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, fermentarem a glicose com ou sem produção de gás, reduzirem o nitrato a nitrito e serem oxidase-negativa. A maioria das cepas de *K.pneumoniae* hidrolisa a uréia pela produção de urease e descarboxila a lisina, mas não a arginina e ornitina. No entanto, a utilização do citrato como fonte de carbono e também a produção de butilenoglicol como produto final da fermentação da glicose (teste de Voges-Proskauer-positivo), são características incomuns para as subespécies *rhinoscleromatis* e *ozaenae* (FARMER III, 1999; KONEMAN et al, 2001).

As espécies do gênero *Klebsiella* estão amplamente distribuídas na natureza. Podem ser encontradas na água, no esgoto, no solo e nas plantas (KONEMAN et al, 2001). São isoladas, também, como colonizantes do ambiente hospitalar em pisos, pias, germicidas e equipamentos inalatórios (HOBSON et al, 1996). São encontradas, ainda, na superfície mucosa de mamíferos como cavalos e suínos, além do homem (PODSCHUN et al, 2001).

Em seres humanos, *K.pneumoniae* está presente como microbiota de mucosas da nasofaringe e do trato gastrintestinal, sendo que as taxas de portadores variam consideravelmente em diferentes estudos. A detecção de *K. pneumoniae* na nasofaringe varia de 1 a 6% da população (DAVIS e MATSEN, 1974; ROSENTHAL e TAGER, 1975 apud PODSCHUN e ULLMANN, 1998). Como microbiota do trato gastrintestinal, *K.pneumoniae* tem sido isolada de 5 a 38% da população (ROSE e SCHREIER, 1968; THOM, 1970 apud PODSCHUN e ULLMANN, 1998) e raramente é

encontrada como microbiota da pele, na população em geral, uma vez que este sítio não oferece boas condições para o desenvolvimento de bactérias Gram-negativas (ROSEBURY, 1962 apud PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

No ambiente hospitalar, as taxas de colonização por *K. pneumoniae* aumentam em razão direta ao tempo de internação do paciente (PEÑA et al, 1998). São relatados percentuais de até 77% nas fezes, 19% na orofaringe e 42% nas mãos (DAVIS e MATSEN, 1974). Altas taxas de colonização por *Klebsiella* podem estar mais associadas ao uso de antimicrobianos do que com os procedimentos hospitalares em si (POLLACK et al, 1972). Porém, há evidências de que alguns procedimentos invasivos em pacientes hospitalizados, como utilização de cateter vesical e/ou intubação para ventilação mecânica, sejam fatores de risco para colonização por *K.pneumoniae* (PEÑA et al, 1998; PIROTH et al, 1998). Pacientes com algumas patologias, como alcoolismo crônico e diabetes, apresentam taxas de 35% e 36% de colonização de *K.pneumoniae* na orofaringe, respectivamente. Fato que favorece o desenvolvimento de pneumonia por este microrganismo (GREENE, 1996).

A facilidade para colonizar mucosas privilegia *K.pneumoniae* como patógeno oportunista (BABINI e LIVERMORE, 2000). Infecções por este agente comprometem, principalmente, o trato urinário e o trato respiratório, levando à bacteremia severa e à pneumonia aspirativa, com altas taxas de morbidade e mortalidade (JARVIS, 1996). A pneumonia adquirida na comunidade, principalmente por indivíduos etilistas crônicos e com comprometimento da função pulmonar, acontece na maioria das vezes, em virtude da dificuldade destes pacientes em eliminar as secreções das vias aéreas superiores, sendo este material aspirado para as vias aéreas inferiores, causando a infecção (HANSEN et al, 1999).

As infecções pulmonares são quase sempre caracterizadas pela evolução rápida e a ocorrência de abscesso pulmonar, indica uma

complicação do quadro clínico. Estas infecções podem estar associadas ainda, à destruição necrótica dos espaços alveolares, formação de cavidades e produção de escarro hemóptico. Situações clínicas como estas, limitam a instituição de terapia antibacteriana efetiva (MATHAI et al, 2001; CORTÈS et al, 2002).

Dentre a variedade de infecções extrapulmonares associadas à *K.pneumoniae*, a infecção urinária, tanto em crianças quanto em adultos, é a mais prevalente (KIL et al, 1997). A meningite é observada em neonatos portadores de derivação ventrículo-peritoneal e em pacientes com procedimentos neurocirúrgicos de grande porte, relacionados ou não a extravasamento de líquido cefalorraquiano (FANG et al, 2000). *K.pneumoniae* também pode causar endocardite (ANDERSON e JANOFF, 1997), infecções dos tecidos moles, feridas cutâneas e enterite (HANSEN et al, 1999).

Os principais fatores de risco para se adquirir infecção por *K. pneumoniae* sugeridos na literatura, são: colonização prévia por *Klebsiella*; tempo prolongado de hospitalização, principalmente em Unidade de Terapia Intensiva (UTI); imunodepressão congênita, adquirida ou secundária a terapias; cateterismo urinário e irrigação vesical; uso de cateter venoso central; utilização prévia de antimicrobianos; presença de patologias crônicas como: diabetes, neoplasias, doença pulmonar obstrutiva crônica e alcoolismo; idade extrema; prematuridade e baixo peso ao nascer (BONTEN e WEINSTEINS, 1996; PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

Outros fatores poderão estar implicados no risco de infecção por *K.pneumoniae*, tais como a ocorrência de leucemia, transplantes, outros procedimentos cirúrgicos extensos e lesão medular (SIU et al, 1999), além da residência do paciente em instituições de assistência fechada, tanto geriátricas quanto pediátricas (TRAUB et al, 2000).

Considerando-se que os quadros infecciosos ocasionados por *K. pneumoniae* são precedidos pela colonização prévia do hospedeiro, vale ressaltar que a frequência da exposição, bem como o aumento no número de colonizantes, podem predispor à infecção, principalmente frente a desequilíbrios no estado imunológico do hospedeiro. Sendo assim, condições que permitam ou promovam a colonização podem ser determinantes no desenvolvimento de infecções hospitalares por este agente (BONTEN e WEINSTEIN, 1996; BOYCE, 1996).

Embora as infecções hospitalares ocasionadas por *K.pneumoniae* também ocorram em enfermarias de queimados e naquelas onde o paciente permanece internado por longos períodos (unidades oncológicas e de cirurgia cardíaca), as UTI, tanto de adultos quanto de neonatos (UTI-Neo), são as unidades hospitalares que proporcionam maior risco para o desenvolvimento de infecções por este microrganismo (PIROTH et al, 1998). Isto se deve, provavelmente, pela gravidade das condições clínicas dos pacientes de UTI, pelos procedimentos invasivos como: uso de sondagem vesical, intubação para ventilação assistida e de cateteres endovenosos, a que os pacientes são submetidos (TRAUB et al, 2000); bem como, pela intensiva utilização de antimicrobianos de largo espectro (GALES et al, 1997).

Deve-se considerar ainda que nas unidades neonatais os riscos se intensificam pela alta manipulação das crianças durante a hospitalização (PIROTH et al, 1998) e pela habilidade que *K.pneumoniae* possui para se disseminar rapidamente no ambiente hospitalar (BISSON et al, 2002), quase sempre levando a surtos de infecção nas UTI-Neo (HART, 1993; PESSOA-SILVA et al, 2003). A colonização intestinal dos RN é a principal fonte de *K.pneumoniae* para a transmissão cruzada, em situações de surto (MONTGOMERIE, 1979; PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

Surtos hospitalares causados por *K.pneumoniae* estão amplamente descritos na literatura (TRAUB et al, 2000; PEÑA et al, 1998; BEM-HAMOUDA et al, 2003), sendo que as mãos do pessoal médico e paramédico são os principais veículos de transmissão deste agente (GONTIJO-FILHO et al, 1985; HERRUZO-CABRERA et al, 2001), já que a colonização de pacientes hospitalizados por microrganismos multiresistentes aos antibióticos ocorre, como resultado da seleção destes no trato gastrointestinal, pelo uso intensivo de antimicrobianos de largo espectro.

Os pacientes colonizados tornam-se, então, reservatórios destes microrganismos, os quais são, secundariamente, transmitidos pelas mãos da assistência e/ou por fômites utilizados nas unidades hospitalares. Desta forma, o fato de o paciente estar colonizado, favorece a infecção cruzada e torna-se uma das principais razões pelas quais as infecções em UTI são difíceis de serem erradicadas (HERRUZO-CABRERA et al, 2001).

K.pneumoniae pode ter sua transmissão carregada, ainda, por produtos farmacêuticos, hemoderivados e/ou por equipamentos médicos contaminados (MONTGOMERIE, 1979; GAILLOT et al, 1998).

1.1- Suscetibilidade de *K.pneumoniae* aos antimicrobianos

K.pneumoniae está entre as espécies mais frequentemente implicadas em infecções hospitalares por cepas resistentes a antimicrobianos. Bactérias Gram-negativas desenvolvem esta resistência tanto por mutações cromossômicas, quanto pela transferência de material genético através de transformação, transdução ou conjugação (PADILLO e COSTA, 1999). Essa resistência pode se dar através de um ou mais dos seguintes mecanismos: alteração na permeabilidade do envoltório da bactéria ao antimicrobiano; efluxo ativo; alteração conformacional e bioquímica do sítio alvo na parede celular; surgimento de vias secundárias de síntese, e/ou inativação enzimática do antimicrobiano. (SANDERS e

SANDERS, 1997, LIVERMORE, 1998). Um dos mecanismos de resistência mais utilizados pelas bactérias Gram-negativas é a produção de enzimas que hidrolisam antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, chamadas beta-lactamases (JACOBY e MEDEIROS, 1991; LIVERMORE, 1995).

1.1.1- Produção de enzimas beta-lactamases

Sabe-se que *K.pneumoniae* apresenta resistência intrínseca à: ampicilina, carbenicilina e ticarcilina, devido à produção de enzimas beta-lactamases do tipo TEM-1 e SHV-1 (FARMER III, 1999; KONEMAN et al, 2001). TEM-1, a primeira beta-lactamase plasmidial descrita em microrganismos Gram-negativos, foi isolada em Atenas no ano de 1963. O termo TEM deriva de “Temoniera”, nome da paciente de cujo material clínico foi isolada a primeira cepa de *Escherichia coli* produtora desta enzima. A enzima SHV-1 foi descrita pela primeira vez em 1972 e assim denominada pela característica química apresentada de variar na sua ligação ao grupo sulfidril - *sulphidril variable* (MEDEIROS, 1995). A codificação das beta-lactamases do tipo SHV nos demais membros da família Enterobacteriaceae, ocorre em plasmídios, enquanto que no gênero *Klebsiella* é, principalmente, cromossomal (LIVERMORE, 1995).

As enzimas beta-lactamases TEM-1 e SHV-1 sofreram mutações pontuais em seus genes, resultando em alterações importantes no sítio de ligação dos beta-lactâmicos e/ou na sua capacidade de hidrólise. Desta forma, a nova classe de beta-lactamases gerada, apresenta um espectro de ação bastante ampliado ou estendido (*extended-spectrum beta-lactamases* – ESBL ou BLEA) sobre os antibióticos beta-lactâmicos, ainda que às custas da alteração de um único aminoácido na molécula protéica (HERITAGE et al, 1999).

1.1.2- Enzimas ESBL

As ESBL, além de conferirem resistência frente as cefalosporinas de primeira geração (cefalotina e cefalexina) (LIVERMORE, 1995), também hidrolisam as cefalosporinas de amplo espectro, que incluem as de terceira geração como cefpodoxima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, além das cefalosporinas de quarta geração como cefepime e cefpiroma. Conferem ainda, resistência aos monobactâmicos, como o aztreonam, que até a ocorrência das ESBL, não eram antimicrobianos susceptíveis à ação enzimática (BUSH, 2001).

As beta-lactamases estão divididas quatro grandes classes moleculares, de A a D, sendo que nas classes A e C, estão as enzimas de maior relevância para a prática clínica (LIVERMORE, 1998). Como característica, as classes A, C e D possuem um sítio ativo de serina, enquanto que as enzimas da classe B, requerem zinco para sua ação, sendo denominadas metaloenzimas (LIVERMORE, 1998; BUSH, JACOBY e MEDEIROS, 1995).

A classificação das ESBL está baseada nas características funcionais e moleculares das beta-lactamases, a qual coloca essas enzimas na classe molecular A, grupo funcional 2 e subgrupo 2be (BUSH, JACOBY e MEDEIROS, 1995). As principais características desse grupo de enzimas são: conferir resistência as oxamino-cefalosporinas e monobactâmicos; não hidrolisarem as cefamicinas (cefexitina e cefotetam) e carbapenêmicos (imipenem e meropenem); serem sensíveis à ação dos inibidores de beta-lactamases como o sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico (SADER e JONES, 1995; WILLIAMS, 1997). As ESBL são codificadas por plasmídios transferíveis e são descritas predominantemente em *E.coli*, *K.pneumoniae* e *Enterobacter* sp., embora possam ser encontradas em outros gêneros da família Enterobacteriaceae (CROWLEY, 2001).

Os genes estruturais codificadores das beta-lactamases do tipo TEM-1 podem ser *bla*_{TEM-1A} e *bla*_{TEM-1B}, enquanto a TEM-2 é codificada apenas pelo gene *bla*_{TEM-2} (GOUSSARD e COURVALIN, 1999). A beta-lactamase do tipo SHV-1 é codificada pelo gene *bla*_{SHV} e possui um estreito espectro de ação com atividade contra penicilinas. SHV-1 foi descrita primeiramente por Knothe e colaboradores (1983), como beta-lactamase cromossomal em *K.pneumoniae*, *K.ozaenae* e *Serratia marcescens*. Posteriormente, foi descrita em elementos geneticamente móveis e com a substituição de uma glicina por serina na posição 238.

A Cefotaximase CTX-M é uma enzima relacionada à classe A na classificação de Bush-Jacoby-Medeiros (1995), de baixa correlação com TEM e SHV, guardando apenas 40% de similaridade. Descrita na Alemanha e no Leste Europeu no início dos anos 90 (MEN-1 ou CTX-M-1), é hoje disseminada em uma vasta área. Estudos filogenéticos da família CTX-M revelaram quatro grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 e Toho. A CTX-M tem sido documentada na Argentina, Uruguai e Paraguai, principalmente em *K.pneumoniae*, mas também em *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Shigella* spp., *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* e *Citrobacter freundii* (CASELLAS, 2000). A afinidade das cefotaximases por cefotaxima, chega a ser 300 vezes maior que a afinidade por ceftazidima e aztreonam, fato que deve ser lembrado no momento da escolha dos substratos utilizados nos testes de detecção. (BONNET et al, 2001; CASELLAS, 2000). Apresentam também, sensibilidade ao bloqueio por inibidores de beta-lactamases, preferencialmente por tazobactam.

Vale ressaltar ainda, que a presença de ESBL pode estar associada, também, a outros mecanismos de resistência, como a produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclina, cloranfenicol e as fluoroquinolonas, tornando o microrganismo produtor de ESBL menos sensível, inclusive, a essas classes de antimicrobianos (EISEN et al, 1995; QUINN, 2001).

Em vista do exposto, a determinação do potencial de resistência de *K.pneumoniae* exige uma avaliação laboratorial criteriosa da suscetibilidade aos antimicrobianos utilizados na prática clínica, uma vez que, mudanças na epidemiologia deste microrganismo, assim como alterações nas características da população internada, podem resultar em terapia ineficaz e dispendiosa.

Além dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, *Klebsiella* sp. também apresenta importantes fatores de virulência. Entre os mecanismos de virulência mais encontrados em *Klebsiella* sp., podem ser citados a produção de cápsula (Antígenos K), Lipopolissacarídeos - LPS (Antígenos O), proteínas de membrana externa- (*Outer membrane protein* – OMP), sideróforos, adesinas fimbriais e não fimbriais, biofilme e a capacidade de resistir ao poder bactericida do soro (ALBERTÍ et al, 1995; LAI et al, 2000; OTMAN et al, 2002).

1.2- Antígenos capsulares

K.pneumoniae de isolados clínicos geralmente produz grande quantidade de polissacarídeo capsular em sua superfície (FAVRE-BONTÉ et al, 1999), o qual é essencial para a sua virulência. (HIGSMITH e JARVIS, 1985). A cápsula é composta por subunidades repetidas de carboidratos, os quais formam várias camadas de estrutura fibrilar que cobrem a bactéria como uma espessa capa (AMAKO et al, 1988), protegendo-a da fagocitose por granulócitos polimorfonucleares e da destruição por fatores bactericidas do soro (AMERINO et al, 1992).

Com base na variabilidade estrutural dos polissacarídeos capsulares, *Klebsiella* sp. tem sido classificada em 77 sorotipos reconhecidos, embora muitas cepas sejam relatadas como não tipáveis. Diferentes sorotipos variam significativamente quanto à sua patogenicidade e relevância

epidemiológica (ORSKOV e FIFE-ASBURY, 1979). A tipagem capsular mostra boa reprodutibilidade, sendo capaz de diferenciar cepas de mesma origem, embora ocorram freqüentemente reações cruzadas entre os 77 tipos sorológicos existentes (PODSCHUN e ULLMANN, 1998). Sahly e colaboradores (2000) demonstraram, através de estudo epidemiológico, que 70% dos casos de bacteremia por *Klebsiella* foram causados por somente 25 dos 77 tipos sorológicos conhecidos.

Há divergências quanto à correlação do tipo sorológico capsular e o sítio anatômico nos processos infecciosos causados por *Klebsiella* sp. No entanto, o sorotipo K2 apresenta-se como o mais virulento e está correlacionado com infecções do trato urinário e respiratório inferior, assim como com infecções sistêmicas. Neste, a completa ausência de manose na estrutura o qualifica quanto à resistência à fagocitose por macrófagos (PODSCHUN e ULLMANN, 1998; LAI et al, 2000; TSAY et al, 2002).

O grau de virulência conferido a um antígeno K em particular está, provavelmente, relacionado ao conteúdo de manose da cápsula, uma vez que sorotipos com baixa virulência apresentam seqüências repetitivas de manose- α -2/3-manose ou L-ramnose- α -2/3-L-ramnose. Essas seqüências são reconhecidas por lectinas da superfície de macrófagos, as quais promovem a opsonização independente e os microrganismos opsonizados são englobados por estas células (ATHAMNA et al, 1991).

O papel da cápsula na resposta inflamatória induzida experimentalmente, sugere que a mesma suprime as respostas imunológicas do hospedeiro, pois inibe a ativação de componentes do complemento, especialmente o C3b, permitindo que a bactéria se multiplique e cause a infecção (WILLIAMS e TOMAS, 1990). Estudos com camundongos infectados por cepas de *K.pneumoniae* capsulada e mutante não capsulado demonstraram respostas imunológicas distintas para os dois grupos. A cepa mutante apresentou maior sobrevida, pois foi englobada

pelas células epiteliais da mucosa desses animais, estimulou o aparecimento de uma grande resposta celular no lavado bronco-alveolar (LBA), com produção de altos níveis de fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6). A cepa capsulada, no entanto, bloqueou a resposta celular e reduziu o aparecimento de citocinas inflamatórias, confirmando desta maneira, o papel da cápsula como imunossupressor (YOSHIDA et al, 2000).

1.3- Aquisição de ferro – produção de sideróforos

O processo infeccioso depende da eficiência com que o microrganismo consegue colonizar, causar alterações patológicas e se disseminar a um novo sítio ou, a um outro hospedeiro. Para colonizar o patógeno requer a aquisição de nutrientes essenciais para o seu crescimento e o ferro é um desses elementos (MIETZNER e MORSE, 1994). O ferro é muito importante para todas as células vivas porque participa de processos bioquímicos e metabólicos, incluindo a transferência de elétrons da cadeia respiratória e a síntese do DNA (GUERINOT, 1994).

Embora o ferro seja encontrado em abundância nos tecidos e fluídos corporais, a quantidade prontamente disponível para a bactéria, na forma de ferro livre, é extremamente pequena (WEINBERG, 1979), sendo da ordem de 10^{-18} M (CROSA, 1984), um valor muito aquém do necessário para o crescimento bacteriano, cerca de 10^{-8} M a 10^{-6} M (LITWIN e CALDERWOOD, 1993).

A maioria do ferro existente no corpo dos mamíferos está complexada, na forma insolúvel, com várias glicoproteínas intracelulares (hemossiderina, hemoglobina, mioglobina e ferritina) e com glicoproteínas extracelulares (transferrina e lactoferrina existentes no sangue, linfa, outros fluídos e na superfície mucosa,). No entanto, em resposta à infecção, o ferro

disponível é reduzido nos compartimentos intra e extracelulares (WOOLDRIDGE e WILLIAMS, 1993).

Para superar a limitação do aporte de ferro, as bactérias também expressam vários sistemas para captação com alta afinidade por este íon, denominados sideróforos. Estes microrganismos são capazes de competir com as proteínas do hospedeiro pelo ferro disponível (WILLIAMS et al, 1987), bem como sintetizar proteínas de membrana externa que funcionam como receptores para os sideróforos e proteínas férricas (GRIFFITHS, 1987 apud VIDOTTO et al, 1994; GUERINOT, 1994).

Vários gêneros da família Enterobacteriaceae sintetizam compostos de baixo peso molecular ligantes do ferro que são derivados de dois diferentes grupos de quelantes. 1º) derivados do fenolato, representado pela enteroquelina ou enterobactina, é um tipo de sideróforo constituído por um trímero do 2,3-dihidroxi-benzoil-serina, o qual é hidrolisado pela enzima esterase após o término de cada ciclo de transporte do íon ((MONTGOMERIE, 1984); 2º) derivados do hidroxamato e representados pela aerobactina. Este sideróforo apresenta elevada afinidade pelo ferro III (10^{23} K), mais estabilidade e melhor solubilidade do que a enteroquelina, sendo reciclado depois de cada ciclo de transporte do ferro (WOOLDRIDGE e WILLIAMS, 1993). Ambos os grupos de sideróforos são capazes de remover o ferro de glicoproteínas como a transferrina e lactoferrina (DALL'AGNOL e MARTINEZ, 1999).

A aerobactina é um composto formado por duas moléculas de lisina e uma de citrato. O complexo aerobactina – Fe III liga-se a um receptor presente na membrana externa da bactéria. Os genes *iuc* e *iutA* codificam as enzimas responsáveis pela síntese da aerobactina e da proteína receptora do complexo, respectivamente. Ambos os genes podem estar situados em plasmídios como o Col V ou, no cromossomo, sendo o sistema aerobactina regulado pela concentração intracelular de ferro, através do gene

cromossomal *fur*. As amostras portadoras do sistema aerobactina têm a vantagem de crescerem em condições de baixas concentrações de ferro, como por exemplo, no tecido subcutâneo, soro e urina (JOHNSON, 1991).

Proteínas de membrana externa cuja expressão em bactérias entéricas é regulada pelo ferro (IROMP), apresentam massa molecular que varia de 74 a 84kDa (NEILANDS, 1982). Em *K.pneumoniae*, a massa molecular da proteína receptora da aerobactina apresenta em torno de 76kDa. Esta IROMP possui funções similares às de 74kDa de *E.coli*, uma vez que ambas possuem sítios de reconhecimento e de ligação para aerobactina férrica (VIDOTTO et al, 1994). Algumas bactérias não só produzem seus próprios sideróforos, mas também receptores capazes de ligarem-se a sideróforos produzidos por outros organismos, além de possuírem mais de um tipo de sistema captador de ferro. (SALYERS e WHITT, 1994).

Desta forma, pode-se concluir que sistemas de captação de ferro mediados pela aerobactina devem ser contribuintes indiretos da patogenicidade do gênero *Klebsiella* (PODSCHUN e ULLMANN, 1998), pois em um ambiente polimicrobiano, *K.pneumoniae* pode utilizar os sideróforos produzidos por outras bactérias em benefício próprio e com menor gasto energético.

1.4- Adesinas, *pili* ou fímbrias

O passo inicial para o desenvolvimento de um quadro infeccioso é a colonização do hospedeiro e para tanto, os microrganismos devem primeiramente aderir às células da superfície mucosa. A aderência bacteriana é feita através de estruturas não flagelares conhecidas como *pilus* ou fímbrias e adesinas não fimbriais. Essas estruturas apresentam inserção na membrana celular e podem ligar-se às mais diversas estruturas

através da interação proteína-carboidrato, em vários epitélios do hospedeiro tais como: urogenital, respiratório e intestinal. Tanto fímbrias quanto adesinas não fimbriais podem estar presentes em todos os membros da família Enterobacteriaceae. (di MARTINO et al, 1995; JARVIS, 1996; PAN et al, 1997).

No trato respiratório, a aderência das bactérias leva à diminuição da microbiota, com proliferação dos organismos patogênicos, seguido da invasão das camadas mais profundas dos tecidos e conseqüente desenvolvimento de pneumonia, principalmente em pacientes sob ventilação mecânica assistida por período prolongado. Fato este sugestivo de que o *pilus* tipo I atua como mediador da colonização bacteriana nas membranas mucosas do hospedeiro (WILLIAMS e TOMAS, 1990).

K.pneumoniae pode expressar *pili* tipo I (CLEGG e GERLACH, 1987), fímbria tipo 3 (GERLACH et al, 1988 , di MARTINO et al, 1995; SEBGHATI et al, 1998), a adesina CF29K (di MARTINO et al, 1995) e a fímbria KPF-28 (di MARTINO et al, 1996).

1.4.1- *Pilus* ou Fímbria tipo 1

As fímbrias ou *pilli* tipo 1, são hemaglutininas manose sensível (MSHA), comumente encontradas nos seguintes gêneros de Enterobacteriaceae: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter*, *Edwardsiella*, *Hafnia*, *Serratia*, *Providencia* sp. e *Erwinia* (CLEGG e GERLACH, 1987), embora sejam observadas diferenças estruturais nas fímbrias apresentadas pelos diversos gêneros bacterianos.

Em *Klebsiella* sp., a fímbria tipo 1 também é codificada pelo operon *fim* e os genes *fimA*, B, C, D, E, F, G e H são bastante conservados, como

em *E.coli* e apresentam grande similaridade, mas não são idênticos (GERLACH et al, 1989; PODSCHUN et al, 1993). O gene *fimA* codifica a subunidade estrutural da fímbria; *fimC* e *fimD* codificam proteínas periplasmáticas pertencentes à família das chaperonas e estão envolvidos na montagem e fixação da fímbria. Os genes *fimE* e *fimB* determinam a variação de fase da expressão fimbrial, controlando a orientação dos pares de base do promotor para o gene *fimA* (ABRAHAM et al, 1985; DORMAN e HIGGINS, 1987). O gene *fimF* está relacionado com a biogênese da fímbria e os genes *fimH* e *fimG* codificam duas subunidades protéicas de 29 e 14kDa, respectivamente, as quais são responsáveis pela íntima adesão a receptores D-manose nas células (ABRAHAM et al, 1985; GERLACH et al, 1989).

Uma vez nos tecidos do hospedeiro, a fímbria tipo 1 pode induzir a atividade de opsonização independente do sistema complemento (OFEK e SHARON, 1988), conhecida como via selectina. Nesta opsonização, as forças de repulsão, que separam os leucócitos das bactérias, estão enfraquecidas pelas características hidrofílicas da fímbria, então, a adesina liga-se aos receptores contendo manose na superfície dos macrófagos e a bactéria é fagocitada (LOCK et al, 1990).

1.4.2- Fímbria tipo 3

A fímbria tipo 3, originalmente descrita como organela de adesão de *Klebsiella* sp. em plantas, é produzida por muitos outros gêneros entéricos. Este tipo de fímbria é produzido através da via das proteínas transmembranas chaperonas, para formar apêndices fimbriais que são rotineiramente detectados pela aglutinação de eritrócitos tratados com ácido tânico ou com aquecimento, mas sua expressão é inibida pela presença de espermidina (GERLACH et al, 1989). A hemaglutinação apresentada por esta fímbria pode ocorrer na presença ou ausência de D-manose, portanto, o

fenótipo de aderência da fímbria tipo 3 é MRHA (GERLACH et al, 1989; SEBGHATI et al, 1998, LANGSTRAAT et al, 2001).

A fímbria tipo 3, codificada por plasmídeo, apresenta peso molecular em torno de 18.500 a 21.500Da (KORHONEN et al, 1983; OLD et al, 1985) e possui, aproximadamente, 4 a 5nm de diâmetro por 0,5 a 2 µm de comprimento (OLD et al, 1985; GERLACH, 1988). São necessários seis genes *mrk* para a síntese desta fímbria, dos quais a subunidade *mrkA* codifica o principal componente fimbrial de 20,5kDa, a proteína MrkA, denominada pilina (LANGSTRAAT et al, 2001). O gene *mrkD* codifica a adesina aglutinina de 34kDa (TARKKANEN et al, 1998).

Os outros genes codificam proteínas que facilitam o transporte e a organização de subunidades fimbriais da membrana externa de *K.pneumoniae*. Estima-se que a proteína MrkB, de 25kDa, juntamente com a proteína MrkC, de 83kDa, estejam envolvidas com a produção da membrana da fímbria tipo 3. A proteína MrkF de 14,5kDa, provavelmente, participa da “ancoragem” do filamento fimbrial na célula hospedeira (ALLEN et al, 1991, HORNICK et al, 1995, SEBGHATI et al, 1998).

Tem sido ressaltada a habilidade da fímbria tipo 3, específica de *K.pneumoniae*, em se ligar à membrana basal e superfície baso-lateral de várias células humanas, tais como: células epiteliais bucais (HORNICK et al, 1992); células epiteliais da traquéia e epitélio brônquico (HORNICK et al, 1991, HORNICK et al, 1992); células tubulares e vasos renais (TARKKANEN et al, 1997). A fímbria tipo 3 apresenta, também, importante papel na aderência e formação de biofilme e matriz protéica extracelular, intensificando a adesão de *K.pneumoniae* aos tecidos, inclusive a superfícies abióticas como próteses e cateteres, facilitando a colonização e a infecção (LIVRELLI et al, 1996; LANGSTRAAT et al, 2001; di MARTINO et al, 2003).

OBJETIVOS

2-OBJETIVOS

2.1- Geral:

- Comparar fenotipicamente e molecularmente cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de amostras clínicas provenientes de infecções nosocomiais, com cepas da microbiota hospitalar e da comunidade extra-hospitalar.

2.2- Específicos:

- Estabelecer o perfil de suscetibilidade de *K.pneumoniae* aos agentes antimicrobianos de uso clínico
 - Detectar, fenotipicamente, a produção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido;
 - Pesquisar seqüências gênicas relacionadas a beta-lactamases de espectro estendido (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M});
 - Investigar a presença e peso molecular de plasmídios;
 - Pesquisar seqüências gênicas do receptor de membrana do sideróforo aerobactina (*iut A*);
 - Pesquisar seqüências gênicas relacionadas a adesinas fimbriais do tipo I (*fim A* e *fim H*) e fímbria tipo 3 (*mrkA* e *mrkD*);
 - Pesquisar seqüências gênicas relativas ao sorotipo capsular K2 de *K.pneumoniae* (*Kkps II*).
-

MATERIAL E MÉTODOS

3- MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado, primeiramente, no Setor de Microbiologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas (LAC), do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (HURNP), do Centro de Ciências da Saúde, onde foram desenvolvidas as atividades de seleção, biotipagem e antibiograma do agente etiológico em estudo, inclusive a investigação da produção de ESBL.

As técnicas moleculares para investigação da presença dos genes dos fatores de virulência, bem como da expressão fenotípica de alguns desses fatores, foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sob a co-orientação da professora doutora Marilda Carlos Vidotto.

3.1- Amostras bacterianas

3.1.1- Amostras hospitalares infecciosas (Hi)

As amostras deste grupo foram procedentes de pacientes, de ambos os sexos, com idade variando entre oito (8) dias e 79 anos e internados em diferentes unidades do HURNP (**Tabela 1**). Os materiais clínicos foram colhidos e cultivados com o objetivo de diagnosticar o processo infeccioso apresentado pelos pacientes durante a internação e, para tanto, foi utilizado para este estudo, apenas um isolado de cada paciente. *K.pneumoniae* deste grupo faz parte do banco de microrganismos multiresistentes do Laboratório de Microbiologia Clínica do HURNP.

No grupo de amostras Hi estão incluídos 25 isolados de *K.pneumoniae* obtidos de diversos materiais biológicos, sendo que a relação e a origem destas amostras estão listadas na **Tabela 1**.

TABELA 1- Discriminação e origem dos isolados clínicos que compõem o grupo de amostras Hospitalares Infecciosas (Hi), bem como o ano em que tais amostras foram obtidas.

Nº-Amostra	Material Biológico	Dados do Paciente			
		Sexo	Idade	Unidade de Internação	Ano
Hi 1	sangue	F	65a	PSM	2002
Hi 2	cateter	M	62a	PSC	2003
Hi 3	secr. abdominal	F	37a	Gineco	1999
Hi 4	secreção pústulas	F	8d	UTI-Neo	1999
Hi 5	secr. abscesso	M	59a	PSC	1999
Hi 6	secreção óssea	M	61a	Ortopedia	1999
Hi 7	sangue	F	8d	UTI-Neo	1999
Hi 8	secr. conjuntival	F	3a	UTI-Ped	1999
Hi 9	líquido pleural	M	38a	MI	1999
Hi10	sangue	M	3a	Pediatria	2000
Hi11	cateter	F	44a	Endócrino	2001
Hi13	urina	M	79a	UTI	1999
Hi17	urina	M	31a	Clín. Médica	2000
Hi19	urina	F	34a	Reumato	2002
Hi20	urina	F	63a	PSM	2001
Hi23	urina	F	4m	Cirur. Infantil	2003
Hi24	secr. abscesso	M	37a	PSC	2003
Hi29	urina	M	4a	PSP	2001
Hi34	fragm.tecido MIE	M	17a	Cirur. Vascular	2003
Hi38	urina	M	19a	PSC	2003
Hi39	líquido peritonal	M	18a	PSC	2003
Hi40	sangue	F	18d	UTI-Neo	2003
Hi41	sangue	M	9d	UTI-Neo	2001
Hi43	fragm.tecido coxa	F	4a	Ortopedia	2003
Hi44	urina	F	1m	PSP	2003

Nº- número dos isolados; F-feminino; M-masculino; a-ano; d-dia; m-mês; PSM - Pronto Socorro Médico; PSC - Pronto Socorro Cirúrgico; Secr.- secreção; UTI- Neo - Unidade Neonatal de Terapia Intensiva; UTI- Ped - Unidade Pediátrica de Terapia Intensiva; MI - Moléstias Infecto-contagiosas; UTI -Unidade de Terapia Intensiva; PSP - Pronto Socorro Pediátrico; fragm.- fragmento; MIE - membro inferior esquerdo.

3.1.2- Amostras hospitalares colonizantes (Hc)

Neste grupo, estão incluídas 25 cepas de *K.pneumoniae* obtidas do banco de bactérias do Laboratório de Microbiologia Clínica do HURNP. As amostras foram isoladas de pacientes de ambos os sexos, com idade variando entre três (3) dias a 85 anos, internados em enfermarias e UTI do referido hospital. A relação e a origem destas amostras estão listadas na **Tabela 2**.

Sistematicamente, a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) determina a coleta de amostras de sangue, urina, secreção traqueal e swab retal de todos os pacientes hospitalizados em uma determinada Unidade, para fins de vigilância epidemiológica e/ou controle de infecção por microrganismos multiresistentes.

A seleção destas amostras foi feita aleatoriamente, a partir de culturas solicitadas ao Serviço Microbiológico de Controle de Infecção Hospitalar (SMCIH) do Laboratório de Microbiologia Clínica do LAC, do HURNP, que apresentaram positividade para *K.pneumoniae*, sem que o paciente apresentasse infecção de qualquer ordem pelo agente investigado, durante a internação, embora tivessem uma ou mais culturas positivas para *K.pneumoniae*.

Os critérios para inclusão das amostras neste grupo seguiram as recomendações do CDC (1998), na qual o paciente deve encontrar-se em bom estado geral e sem sinais ou sintomas de infecção.

TABELA 2- Discriminação e origem dos isolados clínicos que compõem o grupo de amostras Hospitalares Colonizantes (Hc), bem como o ano em que tais amostras foram obtidas.

Nº-Amostra	Material Biológico	Dados do Paciente			
		Sexo	Idade	Unidade de Internação	Ano
Hc 1	secreção traqueal	F	85a	MI	2002
Hc 2	secreção traqueal	F	62a	UTI	2003
Hc 3	secreção traqueal	M	2m	UTI-Ped	2002
Hc 4	secreção traqueal	F	1m	UTI-Ped	2002
Hc 5	secreção traqueal	F	37d	UTI-Neo	2001
Hc 6	secreção traqueal	M	14d	UTI-Neo	2001
Hc 7	swab retal	F	62a	UTI	2003
Hc 8	swab retal	M	56a	UTI	2003
Hc 9	swab retal	F	50a	UTI	2003
Hc10	swab retal	M	30a	UTI	2003
Hc11	swab retal	M	85a	UTI	2003
Hc12	fezes	F	26a	MI	2003
Hc13	swab retal	M	35a	UTI	2003
Hc14	fezes	M	45a	MI	2003
Hc15	swab retal	F	3d	UTI-Neo	2003
Hc16	swab retal	M	2m	UTI-Ped	2003
Hc17	fezes	M	1a	Pediatria	2003
Hc18	swab retal	F	40a	MI	2003
Hc19	fezes	F	50a	Reumato	2003
Hc20	swab retal	F	43a	UTI	2003
Hc21	swab retal	M	1m	UTI-Ped	2003
Hc22	fezes	F	49a	Reumato	2003
Hc23	fezes	F	3m	Pediatria	2003
Hc24	secreção traqueal	M	59a	UTI	2003
Hc25	secreção traqueal	F	7d	UTI-Neo	2001

F-feminino; M-masculino; a - ano; d - dia; m - mês; MI -Moléstias Infecto-contagiosas; UTI - Unidade de Terapia Intensiva; UTI-Ped - Unidade Pediátrica de Terapia Intensiva; UTI-Neo - Unidade Neonatal de Terapia Intensiva.

3.1.3- Amostras comunitárias (Co)

As 25 amostras de *K. pneumoniae* incluídas neste grupo, foram isoladas de fezes recém-emitidas por pessoas de ambos os sexos, com idade variando entre sete (7) dias a 59 anos, que procuraram as Unidades Básicas de Saúde (UBS) para consulta de rotina ou para exame

parasitológico. Foram visitados os Postos de Saúde do Jardim do Sol, da Vila Casoni e da Vila Portuguesa do município de Londrina. Foram selecionadas amostras de fezes de consistência pastosa, não diarréica, provenientes de pessoas que não apresentaram nenhum tipo de infecção aparente, por pelo menos 15 dias antes da coleta da amostra, sendo descartada, inclusive, a presença de infecção urinária no período precedente à coleta. A relação e a origem das amostras deste grupo estão listadas na **Tabela 3**.

Nos casos em que o paciente era RN, foi introduzido um *swab* estéril nas fezes, recém-eliminadas, ainda contida na fralda da criança, homogeneizando a amostra e inoculando o *swab* em meio de transporte Cary Blair (Apêndice 1.9), o qual foi mantido à temperatura ambiente até o processamento. A obtenção das amostras somente foi realizada após a mãe, ou responsável pela criança, ter sido esclarecida verbalmente quanto aos objetivos da pesquisa e após, se permitida a coleta, foi preenchido e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (**ANEXO I**), bem como o protocolo da pesquisa (**ANEXO II**).

3.2- Processamento das amostras

As amostras dos diferentes materiais clínicos foram processadas no Setor de Microbiologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas (LAC), do HURNP, seguindo fluxograma e metodologias padronizadas segundo ISENBERG *et al* (1998). A identificação em gênero e espécie, bem como o teste de sensibilidade aos antimicrobianos automatizados foram realizados através do sistema MicroScan - WalkAway® (Dade-Behring, West Sacramento, CA, EUA), utilizando os painéis para Gram-negativo *Neg Combo Panel Type 20* (NC20) e *Neg/ Urine Combo Type 3* (NUC 3), de acordo com as instruções do fabricante.

TABELA 3- Discriminação e origem dos isolados clínicos que compõem o grupo de amostras Comunitárias (Co), bem como o ano em que tais amostras foram obtidas.

Nº Amostra	Material Biológico	Dados do Paciente			
		Sexo	Idade	Origem da Amostra	Ano
Co 2	fezes	F	28d	UBS	2002
Co 4	fezes	M	8d	UBS	2002
Co 5	fezes	F	18d	UBS	2002
Co 7	fezes	F	12d	UBS	2002
Co 8	fezes	M	7d	UBS	2002
Co 9	fezes	M	20d	UBS	2002
Co11	fezes	F	11d	UBS	2002
Co13	fezes	M	5a	UBS	2003
Co14	fezes	F	6m	UBS	2003
Co16	fezes	M	1a	UBS	2003
Co34	fezes	F	10a	UBS	2003
Co39	fezes	M	3a	UBS	2003
Co47	fezes	F	8m	UBS	2003
Co53	fezes	F	20a	UBS	2003
Co56	fezes	F	3a	UBS	2003
Co59	fezes	M	6a	UBS	2003
Co62	fezes	M	4a	UBS	2003
Co69	fezes	M	7a	UBS	2003
Co71	fezes	F	1a	UBS	2003
Co74	fezes	M	55a	UBS	2003
Co91	fezes	F	1a	UBS	2003
Co99	fezes	F	12a	UBS	2003
Co111	fezes	M	16a	UBS	2003
Co112	fezes	M	4a	UBS	2003
Co120	fezes	F	59a	UBS	2003

Nº- Número de isolados do grupo Co; a- ano; d- dia; m- mês; F -feminino; M-masculino;
UBS- Unidade Básica de Saúde

3.2.1- Cultivo e identificação dos isolados clínicos

As amostras trabalhadas pela rotina microbiológica e caracterizadas como bacilos Gram-negativos em Agar MacConkey - MCA (Difco, Becton-Dickinson and Co., Maryland, EUA) (Apêndice 1.2), foram inicialmente avaliadas quanto às características coloniais macroscópicas, morfo-tintoriais e bioquímicas, segundo técnicas padronizadas (FARMER III, 1999), sendo estocadas somente aquelas compatíveis com *K pneumoniae*, ou seja, colônias convexas, lactose positivas mucóides e não mucóides.

As colônias mucóides foram caracterizadas pela viscosidade quando tocadas, apresentando um fio contínuo entre a colônia e a alça de platina ou swab utilizados. Foram considerados mucóides também, os cultivos que se apresentaram confluentes pela elevada viscosidade, sem que houvesse colônias isoladas sobre o ágar.

Os swabs contendo amostras de fezes recém-eliminadas pertencentes ao grupo Co, foram inoculados imediatamente em meio de transporte Cary-Blair, sendo semeados em placas de MCA em período de tempo inferior a duas horas após a coleta. As placas já semeadas foram incubadas a 37°C por 18 a 24 horas. Foi realizada a análise macroscópica das colônias, sendo selecionadas para provas bioquímicas somente aquelas que se mostraram lactose-positivas.

O comportamento bioquímico foi analisado conforme descrito por Edward e Ewings (1986), através da utilização dos meios de: a)EPM (Apêndice 1.10), onde foram observados os testes de fermentação e oxidação da glicose, desaminação do L-Triptofano (LTD), produção de uréase e de gás sulfídrico (H₂S); b)no meio semi-sólido MILi (Apêndice 1.11), foram analisadas as provas de motilidade, descarboxilação da lisina e produção de indol; c)Agar Citrato de Simmons; d) Ornitina; e) Arginina; f) Gelatina; g) malonato e h) VP. A identificação do agente foi efetuada tanto de forma manual, quanto automatizada.

3.2.2- Estocagem das amostras

Os isolados de *K.pneumoniae* selecionados de cada grupo de amostras foram estocados em microtubos de poliestireno (*Axygen Scientific Inc.* CA, USA), contendo 1,0 mL de Caldo Triptona de Soja- TSB (Apêndice 1.8), e caldo Luria-Bertani-LB (Apêndice 1.6), com adição de 15% de glicerol estéril e armazenadas em freezer -70°C . Todos os ensaios do presente estudo foram realizados a partir destes estoques.

A recuperação das amostras aliquotadas foi obtida pela ativação das mesmas em caldo TSB ou caldo LB, dependendo do protocolo investigado, e incubadas por 18 a 24 horas a 37°C , em atmosfera ambiente, seguida de repique em Agar Sangue (Apêndice 1.5) e Agar MacConkey com nova incubação sob as mesmas condições, para confirmação da pureza dos estoques.

3.3-Avaliação da sensibilidade, *in vitro*, de *K.pneumoniae* aos antimicrobianos.

Após obtenção de colônias puras foram realizados os testes de sensibilidade aos antimicrobianos através dos métodos: a) disco difusão segundo Bauer & Kirby (1966); b) microdiluição automatizada pelo sistema MicroScan - WalkAway® (Dade-Behring, West Sacramento, CA, EUA); e c) os casos duvidosos foram resolvidos com a utilização de fitas de Etest® (AB Biodisk, Solna, Suécia), segundo Silva (2000).

3.3.1- Disco Difusão

Para cada amostra foi preparada uma suspensão bacteriana em caldo Mueller-Hinton - MHB (Difco, Becton-Dickinson and Co., Maryland, EUA) (Apêndice 1.7), com padrão de turbidez correspondente a 0,5 da escala de

McFarland, utilizando-se turbidímetro DADE (West Sacramento, CA, EUA). Após homogeneização da suspensão, a semeadura foi feita em placa (15 x 150mm) contendo Agar Mueller-Hinton - MHA (Difco, Becton-Dickinson and Co., Maryland, EUA) (Apêndice 1.3), seguindo as normas preconizadas pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002).

Os discos de antimicrobianos indicados a seguir foram dispensados nas placas de MHA: amicacina 5 μ g (Cecon, Brasil), amoxicilina / ácido clavulânico 10 μ g/1 μ g (Oxoid, Brasil), cefalotina 10 μ g (Cefar, Brasil), cefazolina 30 μ g (Cefar, Brasil), cefepima 30 μ g (Cecon, Brasil), cefotaxima 30 μ g (Cecon, Brasil), cefotetan 30 μ g (Cecon, Brasil), cefoxitina 30 μ g (Cecon, Brasil), cefpiroma 30 μ g (Cecon, Brasil), cefpodoxima 30 μ g (Cecon, Brasil), ceftazidima 30 μ g (Cecon, Brasil), ceftriaxona 30 μ g (Sensifar, Brasil), cefuroxima 30 μ g (Sensifar, Brasil), ciprofloxacina 5 μ g (Sensifar, Brasil), gentamicina 10 μ g (Cecon, Brasil), imipenem 10 μ g (Cecon, Brasil) e sulfametoxazol / trimetoprim, 1,25 μ g / 23,75 μ g (Cecon, Brasil).

As placas de MHA foram incubadas por 18 a 24 horas, à temperatura de 35°C, medindo-se os halos de inibição do crescimento bacteriano após incubação. De acordo com os halos de inibição, as amostras foram classificadas em sensíveis, intermediárias ou resistentes, utilizando-se os valores de referência para o diâmetro dos halos estabelecidos pelo NCCLS 2002, contidos no **ANEXO III**. Todas as etapas desse procedimento foram realizadas de acordo com a padronização do NCCLS, 2002.

3.3.1.1-Triagem de cepas produtoras de ESBL

Foi realizada a triagem, por disco difusão, das prováveis cepas produtoras de ESBL através da leitura do halo de inibição do crescimento, bem como por microdiluição, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), conforme recomendações do NCCLS (2002), apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 -Comparação dos pontos de corte de sensibilidade, recomendados para antimicrobianos de uso clínico em Enterobacteriaceae, que servem de referência para detecção presuntiva de ESBL.

Antimicrobianos	Outras Enterobacteriaceae		<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> <i>E.coli</i>	
	Tamanho halo (mm) ^a	CIM (µg/ml) ^b	Tamanho halo (mm) ^a	CIM (µg/ml) ^b
Aztreonam (30µg)	≥ 22	≤ 8	≥ 28	≤ 2
Cefotaxima (30µg)	≥ 23	≤ 8	≥ 28	≤ 2
Cefpodoxima (10µg)	≥ 21	≤ 8	≥ 23	≤ 2
Ceftazidima (30µg)	≥ 18	≤ 8	≥ 23	≤ 2
Ceftriaxona (30µg)	≥ 21	≤ 8	≥ 26	≤ 2

^amm, medida do halo de inibição em milímetros;

^bµg/mL, CIM em microgramas por mililitro

Fonte: NCCLS (2002)

3.3.2- Microdiluição

Para realização deste teste seguiu-se a metodologia recomendada pelo fabricante do sistema automatizado MicroScan-WalkAway® (Dade-Behring, West Sacramento, CA, EUA). Foram avaliadas as CIM ou MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) dos seguintes antimicrobianos contidos em cada painel utilizado: amicacina, amoxicilina/clavulanato, ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefalotina, cefepime, cefotetan, cefotaxima,

cefepodoxima, ceftazidima, cefuroxima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem, piperacilina, piperacilina/tazobactam, ticarcilina/clavulanato, tobramicina e sulfametoxazol/ trimetoprim.

O ponto de corte (*breakpoint*) de cada agente antimicrobiano foi definido pelo fabricante como sendo a concentração mais baixa que inibia o crescimento do microrganismo, através da leitura ótica do sistema automatizado. Os valores de referência para os MIC estabelecidos pelo NCCLS (2002) estão contidos no ANEXO III.

3.3.3- Método do Etest®

O método do Etest® foi reservado para o esclarecimento de alguma dúvida relacionada aos métodos de disco difusão e microdiluição. Para tanto, foi preparada uma suspensão bacteriana em MHB, com turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland de cada amostra e semeada em placa de MHA. Dentro do intervalo de 15 minutos as fitas de Etest® foram dispensadas na superfície do ágar e as placas foram incubadas por 18 a 24 horas, à temperatura de 35°C. Os antimicrobianos testados através dessa metodologia foram: cefotaxima, cefotaxima/ácido clavunânico, cefpodoxima/ ácido clavulânico, ceftazidima, ceftazidima/ ácido clavulânico, cefepima, imipenem.

As placas incubadas foram analisadas conforme determinação do fabricante e a CIM foi determinada como sendo a primeira concentração acima da intersecção entre a fita de Etest® e a zona elíptica de inibição de crescimento bacteriano. As amostras foram classificadas como sensíveis, intermediárias ou resistentes, de acordo com os limites de sensibilidade estabelecidos pelo NCCLS para métodos diluicionais (NCCLS 2002). Todos os testes utilizando fitas de Etest® foram realizados rigorosamente de acordo com as instruções do fabricante (AB Biodisk, Solna, Suécia).

3.3.4- Controle de qualidade dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos

Amostras da *American Type Culture Collection* (ATCC), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e ATCC 10031, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, foram utilizadas como controle de qualidade para todos os testes de sensibilidade realizados neste estudo.

3.4- Detecção fenotípica da produção de ESBL

Após o isolamento de colônias puras, foram iniciados os testes para a detecção de cepas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido, através do método de dupla difusão em disco (*double-disc synergism* -DDS), conforme descrito por Jarlier e colaboradores (1988) e do método de combinação de discos (MCD), preconizado por M'Zali e colaboradores (2000), com algumas modificações.

3.4.1- Teste da dupla difusão em disco (DDS)

Para cada amostra foi preparada uma suspensão bacteriana em caldo MHB, com padrão de turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland, utilizando-se turbidímetro DADE (West Sacramento, CA, EUA). Após homogeneização da suspensão, a semeadura foi feita em placa (15 x 90mm) contendo MHA, seguindo as normas preconizadas pelo NCCLS. Em seguida, os discos de antimicrobianos foram dispensados na superfície do agar conforme ilustrado na **Figura 1**. No centro da placa foi dispensado o disco de amoxicilina (10 μ g) / ácido clavulânico (1 μ g) (Oxoid, Brasil), e, distantes 20mm de bordo a bordo deste antimicrobiano, foram colocados cuidadosamente os seguintes discos de antimicrobianos beta-lactâmicos: cefotaxima 30 μ g (Oxoid, Brasil), ceftriaxona 30 μ g (Oxoid, Brasil), ceftazidima 30 μ g (Oxoid, Brasil) e aztreonam 30 μ g (Oxoid, Brasil). As placas foram

incubadas por 18 a 24 horas, à temperatura de 35°C, sendo a leitura do teste feita a seguir.

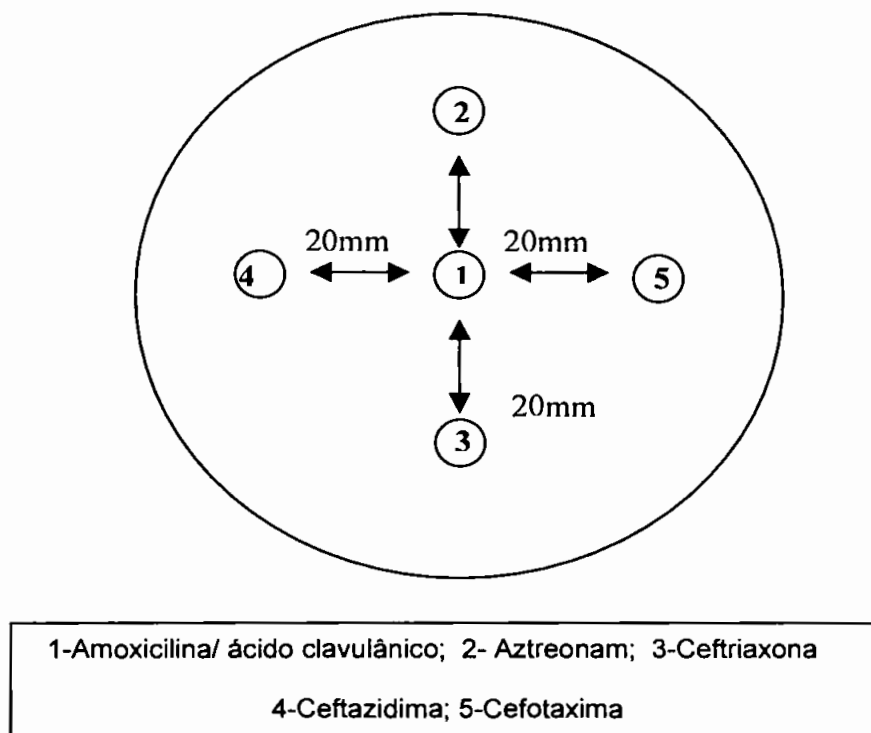


Figura 1 – Esquema para a disposição dos discos antimicrobianos no teste de dupla difusão (DDS).

As amostras foram consideradas como produtoras de ESBL quando se detectou ampliações e/ou distorções nos halos de inibição do crescimento bacteriano por um ou mais antimicrobianos testados, ou ainda, o aparecimento de uma terceira zona de inibição irregular (zona fantasma) na direção central ou na direção do disco de amoxicilina/ clavulanato, conforme ilustrado na **Figura 2**. Vale ressaltar que uma mesma amostra pode apresentar mais de um tipo de beta-lactamase, dependendo da afinidade da mesma frente ao substrato a ser avaliado.

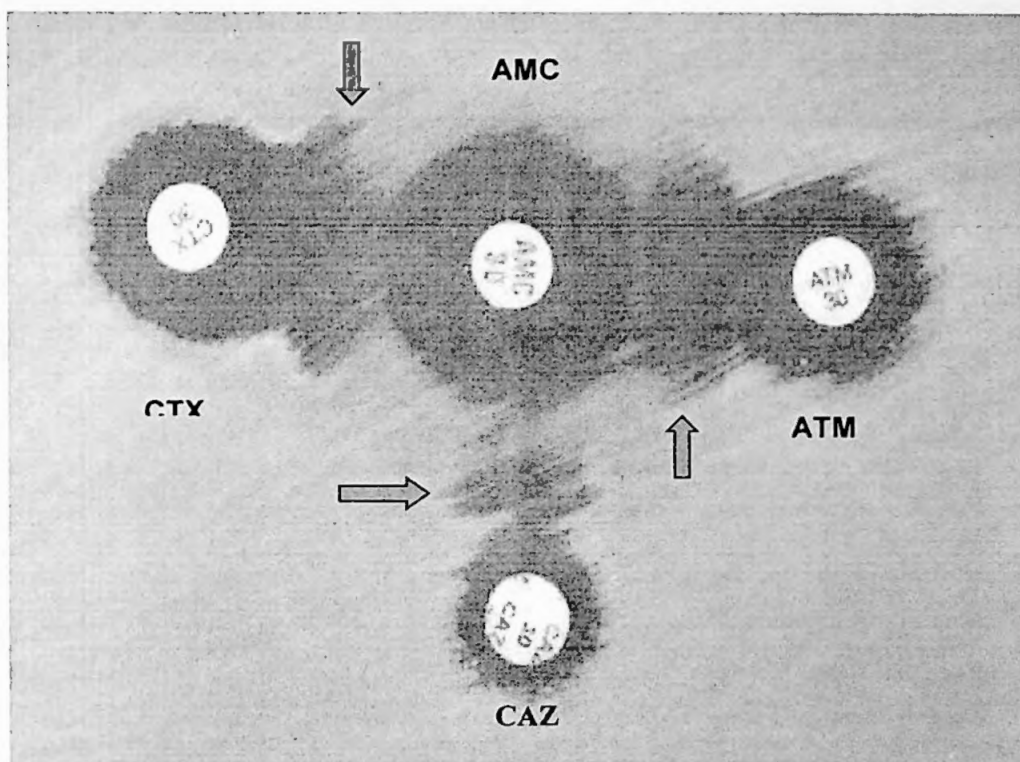


Figura 2- Produção de enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL).

As setas indicam DDS positivo ("zonas fantasmas").

AMC-amoxicilina/ácido clavulânico (10 μ g/ml/ 1 μ g/ml), CTX-cefotaxima (30 μ g/ml), CAZ-ceftazidima (30 μ g/ml), AZT-aztreonam (30 μ g/ml).

3.4.2- Método da combinação de discos – (MCD).

Para efeito de comparação entre as zonas de inibição do crescimento apresentadas pelos discos de cefalosporinas de terceira geração, associados ou não com ácido clavulânico, foram utilizados discos de ceftazidima (CAZ -30 μ g, Oxoid-Brasil), ceftazidima com ácido clavulânico (CAZ/AC -10/1 μ g, Oxoid-Brasil) e cefotaxima (CTX-30 μ g, Oxoid-Brasil) e cefotaxima com ácido clavulânico (CTX/AC -10/1 μ g, Oxoid-Brasil).

Os discos foram dispensados em placas contendo MHA, conforme descrito anteriormente, seguindo recomendações do NCCLS. As placas foram incubadas por 18 a 24 horas, à temperatura de 35°C. As zonas de inibição do crescimento foram medidas em milímetros (mm). A diferença de ≥ 5 mm entre os diâmetros dos halos dos discos de CAZ e CTX sozinhos, quando comparados aos diâmetros dos halos das cefalosporinas associadas com ácido clavulânico, foi indicativa da produção de ESBL. A **Figura 3** ilustra um teste positivo para ESBL pelo método da comparação de discos.

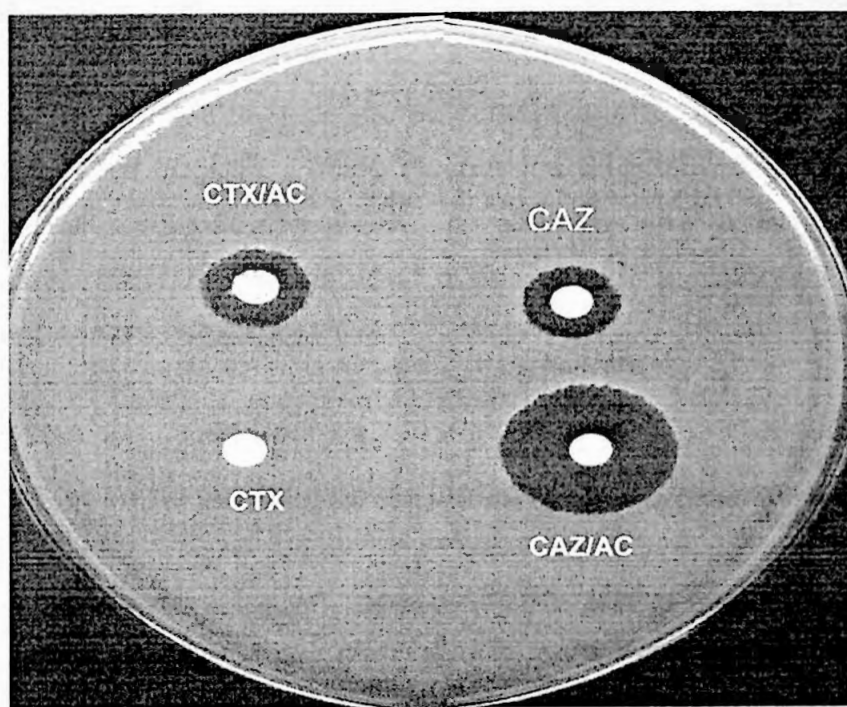


Figura 3- Demonstração da produção de enzimas ESBL pelo método de comparação de discos (MCD).

CAZ -Ceftazidima (30 μ g); CAZ/AC - Ceftazidima / ácido clavulânico (10 μ g/ 1 μ g);

CTX - cefotaxima (30 μ g); CTX/AC – Cefotaxima/ ácido clavulânico (10 μ g/ 1 μ g) .

3.4.3- Método confirmatório da produção de ESBL (Etest®)

Foram utilizadas fitas de Etest Screen^(R), específicas para detecção da produção de ESBL, apenas para os casos em que houve discordância entre os resultados da microdiluição e DDS. Para tanto, foi preparada uma suspensão bacteriana em MHB, com turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland de cada amostra e semeada em placa de MHA. Dentro do intervalo de 15 minutos, as fitas de Etest® foram dispensadas na superfície do ágar e as placas foram incubadas por 18 a 24 horas, à temperatura de 35°C. Os antimicrobianos testados através desta metodologia foram: cefotaxima (0,02 a 32µg/ml), cefotaxima (0,125 a 8µg/ml), /ácido clavunânico (2µg/ml), ceftazidima (0,5 a 32µg/ml), ceftazidima (0,125 a 8µg/ml), / ácido clavulânico (2µg/ml). Foi considerada positiva para a produção de ESBL, a amostra que apresentou uma diminuição da MIC em duas ou mais vezes a concentração do antimicrobiano testado sozinho.

3.5- Caracterização de plasmídios de isolados de *K.pneumoniae*.

Os isolados estocados em freezer -70°C, foram avaliados quanto à presença de DNA plasmidial seguindo-se o método de KADO & LIU (1981), com algumas modificações.

As amostras foram recuperadas através do crescimento em LB por 18 a 24 horas a 37°C, sob agitação constante até a fase estacionária, após o que, 1,5ml da suspensão foi dispensado em microtubos novos e estéreis de poliestireno (*Axygen Scientific Inc.*, CA, USA) e centrifugado em microcentrífuga refrigerada a 4°C (*Vision 15.000CFNII- Kyonggi Province, Korea*) a 14000 x g por 10 minutos. Desprezado o sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em 1mL de tampão Tris-EDTA -TE, pH 8,0 (Apêndice 2.2). Centrifugado novamente sob as mesmas condições

anteriores desprezando o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 100 μ L de tampão TE, pH 8,0. Foram adicionados 400 μ L de tampão de lise, pH 12,45 (Apêndice 2.4) em microtubos novos e estéreis, de poliestireno, onde foram depositados 50 μ L da suspensão de células. O tubo foi invertido delicadamente por cinco vezes para homogeneizar a suspensão. A mistura foi deixada em banho-maria a 60°C, durante 30 minutos e resfriada em banho de gelo. Após este período, foram adicionados 20 μ L de tampão Tris-HCl, pH 7,0 (Apêndice 2.1) sendo colocados 500 μ L da mistura de fenol-cloroformio saturado (vol/vol) (Apêndice 2.7) e invertido os tubos delicadamente por cinco vezes para homogeneizar a mistura. A seguir foi centrifugado em microcentrífuga refrigerada a 4°C a 15000 x g por 10 minutos.

Foram separados 60 μ L do sobrenadante, misturados a 12 μ L de ficol-azul de bromofenol 0,025% (Apêndice 2.5) em TE pH 8,0 e aplicados em gel de agarose a 0,8% (Apêndice 1.1). A corrida eletroforética foi realizada em cuba vertical, processada sob 100V e 30mA, por aproximadamente 3 horas e corada com brometo de etídio 1,0mg/ml, durante 15 minutos. O gel, depois de corado, foi visualizado em transiluminador (*Image Master VDS* - Pharmacia Biotech, Suécia) e as bandas de DNA plasmidial foram fotografadas (*Thermal Imaging System FTI-500- Fuji Film*).

3.5.1- Cepas referenciais de plasmídios

Foram utilizadas as cepas referenciais cujos plasmídios apresentam massa molecular conhecida, as quais estão relacionadas na **Tabela 5**.

Para estimar a massa molecular dos plasmídios observados nas amostras de *K.pneumoniae* testadas, foi utilizado programa SEQAID II, versão 2.2, (*Molecular Genetics Laboratory, Kansas State University*), o qual está baseado na regressão linear de plasmídios referenciais, fornecendo um valor aproximado da massa molecular, segundo RHOADS e ROUFA (1987).

TABELA 5- Relação dos plasmídios referenciais utilizados no método de KADO e LIU (1981) modificado.

Plasmídios	Cepa hospedeira	M.M (MDa)	Características de resistência	Origem
R27	<i>E.coli</i> V517	110	tc	Brito et al, 2001
JPN11	<i>E.coli</i> V517	66	kn	Brito et al, 2001
RP4	<i>E.coli</i> V517	34	ap,kn,tc	Brito et al, 2001
pSa	<i>E.coli</i> J53	23	clo,kn,st	Datta e Hedges, 1975

tc- tetraciclina; kn- canamicina, ap-ampicilina; clo- cloranfenicol, st- streptomina

3.6- Pesquisa de seqüências gênicas relacionadas à resistência antimicrobiana e a fatores de virulência de *K.pneumoniae*, por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas para verificar se as amostras de *K.pneumoniae* apresentavam, em seu genoma, as seqüências de genes relacionadas à produção de beta-lactamases de espectro estendido dos tipos TEM (*bla*_{-TEM}), SHV (*bla*_{-SHV}) e do tipo CTX-M (*bla*_{-CTX-M}), cujos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) estão descritos na **Tabela 6**.

Verificou-se também, através das reações de PCR, se as amostras de *K.pneumoniae* apresentavam, em seu genoma, as seqüências de genes relacionadas aos vários fatores de virulência, constantes na **Tabela 6**. Os genes (*fimA* e *fimH*) codificam fimbria tipo I de *Klebsiella* sp., (*iutA*), codifica o receptor de membrana para o sideróforo aerobactina; (*kpsII*) codifica a cápsula sorotipo K2 de *Klebsiella* sp., (*mrkA* e *mrkD*) codifica fimbria tipo 3, Com este propósito, foram utilizados como iniciadores (*primers*) os oligonucleotídeos, também descritos na **Tabela 6**.

TABELA 6 - Seqüências de oligonucleotídeos, tamanho do fragmento amplificado (pb) e temperatura de hibridização utilizados para estudo dos fatores de resistência e virulência de *K.pneumoniae*, pela técnica de PCR.

Genes	Oligonucleotídeos (5'-----3')	Tamanho do Produto de PCR amplificado (pb)	Temperatura de hibridização (°C.)	Referências
<i>bla</i> _{TEM}	(F) ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG (R) CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA	716	58	Pompa-Féria e Caniza, 2003
<i>bla</i> _{SHV}	(F) GTT ATG CGT TAT ATT CGC C (R) TTA GCG TTG CCA GTG CTC	950	55	Preston e Venezia,2000
<i>bla</i> _{CTX-M}	(F) CGC TTT GCG ATG TGC CAG (R) ACC GCG ATA TCG TTG GGT	550	55	Dutour et al, 2002
<i>fimA</i>	(F) CAG ATC ATT TAT CCC AAC GAC (R) TTA CTC GTA CTG CAC TTT GAA C	715	58	Gerlach et al, 1989
<i>fimH</i>	(F) TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG (R) GCA GTC ACC TGC CCT CCG TGG	506	63	Gerlach et al,1989
<i>iutA</i>	(F) GGC TGG ACA TCA TGG GAA CTG G (R) CGT CGG GAA CGG GTA GAA TCG	300	63	Johnson e Stell, 2000
<i>KkpII</i>	(F) TAT TAA TTG CTG ATA CTG TTG (R) CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAG CA	419	52	Arakawa et al, 1995
<i>mrkA</i>	(F) TCT GCT GCA ATG GCA ACT GCG (R) TCG CGT AGC TGT TAA CCA CAC	560	63	Allen et al, 1991
<i>mrkD</i>	(F) TTA TTG GCT TAA TGG CGC TGG (R) ATC GTA CGT CAG GTT AAA GAC	943	55	Sebghati et al, 1998

(F)- sense; (R)-antisense.

3.6.1- Extração do DNA para PCR

Para extração do DNA, as amostras bacterianas foram cultivadas em caldo LB (Apêndice 1.6), durante 18h a 37°C. Um mililitro da cultura foi transferido, sob condições assépticas, para microtubo (*Axygen Scientific Inc.,CA,USA*) e centrifugado em microcentrífuga refrigerada a 4°C (*Vision*

15.000CFNII- Kyonggi Province, Korea) a 13000 x g por um minuto. O sedimento foi ressuspensionado em 100 µL de água bidestilada estéril e submetida à fervura, em banho-maria, durante 10 minutos. Após o resfriamento da solução em gelo, a mesma foi centrifugada a 8.100 x g por cinco minutos. Foram transferidos 150µl do sobrenadante para novos microtubos estéreis e estocados a -20°C até o momento do uso. Todas as reações de PCR, do presente trabalho, foram realizadas a partir deste estoque.

3.6.2- Reação de amplificação do DNA

Cinco microlitros das preparações de DNA, manipulados assepticamente e mantidos em banho de gelo, foram homogeneizados com 20µL de solução contendo 0,2mM de cada nucleotídeo (dNTP), 0,5pM/µL dos oligonucleotídeos iniciadores (F)- *sense* / (R)- *anti-sense* e 1U de Taq DNA-polimerase (Biotools, B & M Labs, S.A.- UNISCIENCE do Brasil, São Paulo -SP, Brasil), em tampão de PCR 10X concentrado (Apêndice 2.8). A amplificação do DNA bacteriano foi realizada em termociclador (*Gene Amp*® PCR System 9700, Perkin Elmer, Norwalk, CT).

Para as reações de PCR, nas quais se pesquisou os genes de resistência antimicrobiana utilizou-se o seguinte protocolo: *bla*_{TEM} - denaturação (95°C – 1 min.); hibridização (58°C – 1 min.) e extensão (72°C – 1 min.) por 45 ciclos . Para o gene *bla*_{SHV} - denaturação (95°C – 1 min.); hibridização (55°C – 1 min.) e extensão (72°C – 1 min.) por 30 ciclos. Para o gene *bla*_{CTX-M} - denaturação (95°C – 30 seg.); hibridização (55°C – 30 seg.) e extensão (72°C – 30seg.), por 40 ciclos.

Quanto às seqüências gênicas, relacionadas aos fatores de virulência investigados, as mesmas foram submetidas a reações de 30 ciclos de um minuto a 94°C (fase de denaturação), um minuto variando a temperatura de hibridização para cada oligonucleotídeo iniciador específico da reação,

conforme consta na **Tabela 6** e, dois minutos a 72°C (fase de alongamento ou extensão).

3.6.3- Cepas padrão para PCR

As cepas bacterianas padrões específicos para cada fator de virulência, descritas na **Tabela 7**, foram utilizadas em cada reação de PCR realizada. Como controle negativo, foram empregadas a cepa de *E.coli* HB101 e água bidestilada, ultrapura e estéril, em substituição ao DNA. As cepas padrão, utilizadas para pesquisa das seqüências gênicas de beta-lactamases, foram gentilmente cedidas pelo Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC), da Escola Paulista de Medicina.

TABELA 7 - Cepas padrão de bactérias utilizadas para os diferentes marcadores de PCR.

Cepas padrão	Genes		Marcadores	Origem
	investigados			
<i>K.pneumoniae</i>	<i>mrkA</i>		Pilina da fímbria tipo 3	ATCC 10031
<i>K.pneumoniae</i>	<i>mrkD</i>		Adesina da fímbria tipo 3	ATCC 13883
<i>K.pneumoniae</i>	<i>kpsII</i>		Cápsula sorotipo K2 de <i>K. pneumoniae</i>	ATCC 13993
<i>K.pneumoniae</i>	<i>fimA</i>		Pilina de fímbria tipo I	ATCC 10031
<i>K.pneumoniae</i>	<i>fimH</i>		Adesina da fímbria tipo I	ATCC 10031
<i>E.coli</i> V-27	<i>fimA</i> e <i>fimH</i>		Fímbria tipo I	Johnson e Steel (2000)
<i>E.coli</i> TEM	<i>bla</i> ^{TEM}		Beta-lactamase tipo TEM	LEMC/EPM
<i>E.coli</i> SHV	<i>bla</i> ^{SHV}		Beta-lactamase tipo SHV	LEMC/EPM
<i>P.mirabilis</i> CTX	<i>bla</i> ^{CTX-M}		Beta-lactamase tipo cefotaximase	LEMC/EPM
<i>E.coli</i> Hb101			Controle negativo das reações	oyer e Roulland-ussoix, (1969)

ATCC- American Type Culture Collection; LEMC- Laboratório Especial de Microbiologia da Escola Paulista de Medicina (EPM)-SP.

3.6.4- Análise dos produtos amplificados na PCR

Após o período de amplificação, uma alíquota de 10 μ L do produto amplificado foi utilizada para eletroforese em gel de agarose, cuja concentração variou de 1 a 2%, de acordo com o tamanho do fragmento amplificado, em solução de Tris-EDTA-Borato (TEB), pH 8,4 (Apêndice 2.3), sob voltagem constante de 100V, durante 60 minutos, aproximadamente. Padrão de peso molecular (100pb) (*DNA Ladder, Invitrogen Life Technologies*, São Paulo, SP. Brasil) foi incluído em cada gel.

O gel foi corado com solução a 0,5 μ g/ml de brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (*Image Master VDS, Pharmacia Biotech, Suécia*). A imagem do gel foi processada pelo programa *Adobe Photoshop®*, versão 5.0, por intermédio do *Thermal Imaging System –FTI500- Fuji Film*.

3.7 – Análise estatística

A análise descritiva da amostra foi apresentada através da mediana, o mínimo e máximo. Para a associação entre as variáveis, nos 3 diferentes grupos, foi utilizado o teste do *Qui-quadrado* ou o teste Exato de Fisher, conforme suas respectivas indicações. Para calcular a magnitude da associação foram utilizados o *Odds ratio* (OR) e seu respectivo intervalo de confiança (IC). Para a comparação das variáveis contínuas, foi utilizado o teste de Wilcoxon Rank Test (Wilcoxon Mann Withney). Diferenças significativas foram estabelecidas por $p < 0,05$.

RESULTADOS

4-RESULTADOS

4.1- Casuística

As cepas de *K.pneumoniae*, pertencentes ao grupo Hi utilizados nesta pesquisa, foram oriundas de pacientes do sexo masculino, em 52% e feminino, em 48%. Os materiais clínicos empregados eram constituídos de: urina (32%), secreções (28%), sangue (20%), ponta de cateter (8%), líquido pleural (4%), líquido peritoneal (4%) e fragmento de tecido (4%).

As amostras do grupo Hc foram oriundas de pacientes do sexo feminino, em 52% e sexo masculino, em 48%. Os materiais biológicos utilizados na pesquisa foram compostos por: swab retal em 44%, secreção traqueal em 32% e fezes em 24%.

K.pneumoniae isoladas do grupo Co foram provenientes de pacientes do sexo feminino, em 52% e sexo masculino em 48%. O material biológico utilizado no presente estudo foi composto por fezes, em sua totalidade.

4.2- Caracterização colonial e bioquímica

As amostras de *K.pneumoniae* de origem Hi, Hc e Co apresentaram padrão de colônias lactose positiva mucóides em 80%, 72% e 40%, respectivamente, quando subcultivadas em Agar MacConkey e incubadas a 37°C por 18 a 24 horas. Conforme análise estatística aplicada através do teste do *Qui quadrado* (X^2) observou-se que a diferença entre os percentuais apresentados pelos grupos Hi e Co, quanto ao morfotipo mucóide das colônias, foi estatisticamente significativa com $p=0,009$, *Odds ratio* (OR) de 3,86 e intervalo de confiança (IC95%) variando de 1,18 a 12,6. Da mesma

forma, a diferença entre os percentuais demonstrados pelos grupos Hc e Co, apresentaram significância estatística com [$p=0,046$, OR de 6,0 e (IC95% variando de 1,69 a 21,26)].

A identificação automatizada de todas as amostras forneceu a probabilidade de 99,35 a 99,98% para o gênero *Klebsiella*, espécie *pneumoniae*. Os resultados obtidos, frente aos diferentes substratos utilizados, determinaram a presença de cinco biotipos prevalentes, os quais estão apresentados na **Tabela 8**.

O biotipo I, considerado padrão para os isolados de *K.pneumoniae* conforme cepa ATCC 13883, apresentou-se sensível frente ao antibiótico cefalotina. O biotipo II apresentou identificação bioquímica semelhante ao biotipo I, porém, resistente a cefalotina, segundo cepa padrão ATCC 10031. No biotipo III, as amostras de *K.pneumoniae* apresentaram resultado negativo para o teste de fermentação do adonitol. O biotipo IV agrupa as cepas de *K.pneumoniae* que se mostraram negativas para o teste de VP. No biotipo V, os isolados de *K.pneumoniae* se mostraram negativos para o teste de ONPG (orto-nitrofenil-beta-D-galactopiranosídeo) e resistentes a cefalotina. O biotipo VI agrupa cepas de *K.pneumoniae* que apresentam ONPG e VP negativos, enquanto que no biotipo VII, a esculina é negativa. No biotipo VIII, os isolados de *K.pneumoniae* apresentam além da esculina negativa, resistência a cefalotina. O biotipo IX agrupa amostras de *K.pneumoniae* que apresentam adonitol e urease negativas. No biotipo X, os isolados de *K.pneumoniae* foram lisina negativa, enquanto que o biotipo XI, demonstrou isolados com adonitol e ornitina negativos. O biotipo XII agrupa amostras de *K.pneumoniae* com rafinose negativa. A distribuição e o percentual de cada biotipo, nos diferentes grupos, estão demonstrados na **Tabela 1 do ANEXO IV**.

TABELA 8- Principais biotipos apresentados pelos isolados de *K.pneumoniae* frente ao substrato investigado.

Substratos	Biotipo I (CF-S)	Biotipo II (CF-R)	Biotipo III (Adonitol -)	Biotipo IV (VP -)	Biotipo V (ONPG-) (CF-R)
Urease	+	+	+	+	+
VM	-	-	-	+	-
VP	+	+	+	-	+
Citrato	+	+	+	+	+
Lisina	+	+	+	+	+
Arginina	-	-	-	-	-
Ornitina	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+
Adonitol	+	+	-	+	-
Arabinose	+	+	+	+	+
CF	-	+	-	-	+
Esculina	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+
Malonato	+	+	+	+	+
Melbiose	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+
Ramnose	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	-

(-) reação negativa para o substrato após incubação de 24h a 37°C;

(+) reação positiva para o substrato, após incubação de 24h a 37°C;

VM – vermelho de metila; VP- reação de Voges-Proskauer;

CF-S - sensível a cefalotina; CF-R - resistente a cefalotina;

ONPG- orto-nitrofenil-beta-D-galactopiranosídeo

A Tabela 9 demonstra os principais biotipos encontrados. Onde o biotipo I, sensível a cefalotina, foi o mais freqüente dentro do grupo de isolados Co, com 44% das amostras, apresentando resultado estatisticamente significativo, com [$p=0,009$, $OR=7,45$ ($IC_{95\%}$ variando de 1,51 a 69,63)] . As amostras do grupo de isolados Hi apresentaram o biotipo II, resistente a cefalotina, em 48% das cepas,

demonstrando significância estatística com [$p=0,004$ OR=10,62 (IC_{95%} variando de 2,05 a 54,95)]. O grupo de isolados Hc de *K.pneumoniae* apresentou amostras tanto do biotipo I (36%), quanto do biotipo II (32%). Quando comparados os percentuais obtidos pelos grupos Hi e Hc, os valores de [$p=0,04$, OR=5,41 (IC_{95%} variando de 1,06 a 50,43)], mostraram-se significativos.

TABELA 9- Distribuição dos principais biotipos apresentados pelos isolados de *K.pneumoniae* dos grupos Hi, Hc e Co investigados.

Biotipos	Hi (N=25)		Hc (N=25)		Co (N=25)		Total	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
I (CF-S)	2	(8) ^{a,b}	9	(36) ^a	11	(44) ^b	22	(29,3)
II (CF-R)	12	(48) ^c	8	(32)	2	(8) ^c	22	(29,3)
III (Ad -)	2	(8)	4	(16)	5	(20)	11	(14,5)
IV (VP-)	2	(8)	1	(4)	4	(16)	7	(9,4)
V (CF-R) (ONPG -)	3	(12)	2	(8)	0	(0)	5	(6,7)
VI (Outros)	4	(16)	1	(4)	3	(12)	8	(10,7)

N – número de isolados; (%) – percentual; CF-S – sensível a cefalotina; CF-R – resistente a cefalotina; Ad(-) – adonitol negativo; VP(-) – Voges Proskauer negativo; ONPG(-) – orto-nitrofenil-Beta-D-galactopiranosídeo negativo; a – $p=0,04$; b – $p=0,009$; c – $p=0,004$, valores significativos estatisticamente ($p<0,05$).

4.3- Avaliação da suscetibilidade das amostras de *K.pneumoniae* aos antimicrobianos.

4.3.1- Método de disco difusão

As amostras de *K.pneumoniae*, dos grupos Hi, Hc e Co, foram avaliadas frente aos antimicrobianos de uso clínico, através do método de disco difusão (Tabela 2 - ANEXO III) e o perfil de sensibilidade demonstrado para os aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, quinolonas e sulfametoxazol/ trimetoprim está apresentado na Figura 4.

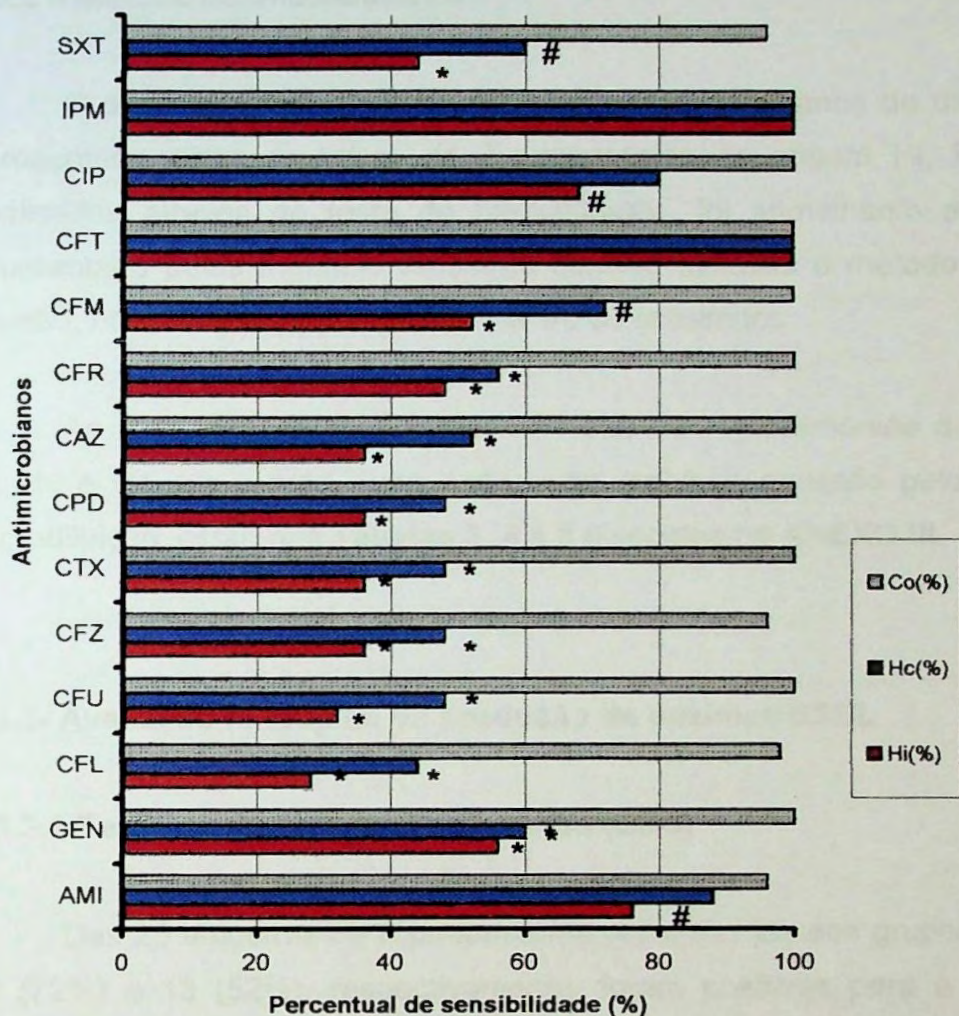


Figura 4- Perfil de sensibilidade demonstrado pelos isolados Hi, Hc e Co frente aos antimicrobianos aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, quinolonas e sulfametoxazol-trimetoprim.

AMI-amicacina, GEN-gentamicina, CFL-cefalotina, CFU-cefuroxima, CFZ-cefazolina, CTX- cefotaxima, CPD- cefpodoxima, CAZ-ceftazidima, CFR- ceftriaxona, CFM-cefepima, CFT-cefotetan, CIP-ciprofloxacina, IPM- imipenem, SXT-sulfametoxazol/ trimetoprim.

percentuais com significância estatística ($P < 0,05$).

* percentuais com significância estatística ($P < 0,001$).

4.3.2 – Método de microdiluição

O perfil de suscetibilidade frente aos antimicrobianos de uso clínico, apresentado pelas amostras de *K.pneumoniae* de origem Hi, Hc e Co, analisadas através do teste de microdiluição, foi semelhante ao padrão apresentado pelas mesmas amostras quando utilizado o método de disco difusão, não havendo discrepâncias entre os resultados.

As CIM apresentadas pelas amostras de *K.pneumoniae* dos grupos Hi, Hc e Co em estudo, para cada antimicrobiano avaliado pelo teste de microdiluição, estão nas **Tabelas 3, 4 e 5** dispostas no **ANEXO III**.

4.3.3- Avaliação fenotípica da produção de enzimas ESBL

4.3.3.1-Teste da dupla difusão em disco (DDS)

Das 25 amostras de *K.pneumoniae* pertencentes aos grupos Hi e Hc, 18 (72%) e 13 (52%), respectivamente, foram positivas para a produção fenotípica de ESBL, através do teste DDS. As amostras do grupo Co foram negativas, em sua totalidade, para a produção de ESBL por este teste.

Nos testes DDS-positivos, o duplo halo ou “zona fantasma”, foi observado, principalmente, entre os discos de cefotaxima (CTX) e a associação amoxicilina/ácido clavulânico (AMC), mostrando a produção de ESBL do tipo cefotaximase (CTX-M). Foi exceção o isolado Hc15 que mostrou o duplo halo entre o disco de ceftazidima (CAZ) e de AMC, sendo confirmado com Etest®.

4.3.3.2- Método de comparação de discos (MCD)

As cefalosporinas de terceira geração, ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX), isoladas e em associação com o ácido clavulânico (CAZ/AC e CTX/AC, respectivamente), foram utilizadas como substratos para indicar a produção de enzimas ESBL pelas amostras de *K.pneumoniae* dos grupos Hi e Hc. Os isolados foram considerados produtores de beta-lactamases quando a diferença no tamanho do halo de inibição foi ≥ 5 mm.

A **Tabela 10** mostra os tamanhos dos halos (mm) observados para CAZ e CTX isoladamente e após a associação com o ácido clavulânico (AC), para as 18 amostras de *K.pneumoniae* produtoras de ESBL do grupo Hi. As diferenças nos tamanhos dos halos do grupo Hi foram estatisticamente significativas, quando utilizado o Wilcoxon Rank Test (Wilcoxon Mann Withney), com [$p= 0,003$ (IC95% variando de (-)8,02 a (-) 1,76)]. A mediana = $1\text{mm} < 9,5 > 19\text{mm}$.

Da mesma forma, as diferenças nos tamanhos dos halos apresentados pela associação com clavulanato nas 13 amostras de *K.pneumoniae* do grupo Hc, mostraram significância estatística, com [$p < 0,001$, IC95% variando de (-)11,43 a (-)3,8)]. Mediana= $9\text{mm} < 14,5 > 20\text{mm}$. Estes dados estão apresentados na **Tabela 11**.

TABELA 10 – Comparação entre os diâmetros dos halos de inibição apresentados pelas cefalosporinas ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX) isoladamente, e em associação com ácido clavulânico (AC), frente aos isolados Hi.

Isolados Hi ESBL	CAZ (mm)	CAZ/AC (mm)	Diferenças tamanhos halos (mm) ^a	CTX (mm)	CTX/AC (mm)	Diferenças tamanhos halos (mm) ^b
N=18						
Hi 1	12	25	13	6	22	16
Hi 2	14	25	11	7	25	18
Hi 3	13	31	18	20	35	15
Hi 4	17	28	11	13	31	18
Hi 8	25	27	2	23	33	10
Hi 9	21	31	10	25	35	10
Hi10	13	29	16	6	25	19
Hi11	22	24	2	23	33	10
Hi13	18	25	7	20	29	9
Hi17	19	26	7	9	25	16
Hi20	18	27	9	20	29	9
Hi23	17	28	11	22	33	11
Hi29	17	25	8	17	35	18
Hi38	18	19	1	6	20	14
Hi39	6	25	19	6	26	20
Hi40	25	29	4	13	27	14
Hi41	17	27	10	6	24	18
Hi43	18	25	7	20	29	9

N- número de isolados do grupo Hi; (mm)- milímetros; CAZ- ceftazidima (30µg); CAZ/AC- Cefotaxidima (10µg) associada ao ácido clavulânico (1µg); CTX- cefotaxima (30µg); CTX/AC- cefotaxima (10µg) associada ao ácido clavulânico (1µg);

a- $p=0,003$ -dados estatisticamente significativos ($p<0,05$)- (mediana= 1mm<9,5> 19mm

b- $p<0,0001$ -dados estatisticamente significativos ($p<0,05$)- (mediana= 9mm<14,5> 20mm).

TABELA 11 – Comparação entre os diâmetros dos halos de inibição apresentados pela ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX) isoladamente e em associação com ácido clavulânico (AC), frente aos isolados Hc.

Isolados Hc	ESBL N=13	CAZ (mm)	CAZ/AC (mm)	Diferenças tamanhos halos (mm) ^a	CTX (mm)	CTX/AC (mm)	Diferenças tamanhos halos (mm) ^b
Hc 1		21	23	2	11	23	12
Hc 3		10	19	9	6	19	13
Hc 4		27	27	0	10	26	16
Hc 9		17	22	5	6	22	16
Hc11		11	19	8	6	21	15
Hc12		17	23	6	10	21	11
Hc15		8	25	17	22	28	6
Hc18		18	20	2	9	18	9
Hc20		15	20	5	6	19	13
Hc21		22	26	4	18	35	17
Hc22		14	30	16	12	33	21
Hc23		17	18	1	9	27	18
Hc25		18	22	4	9	20	11

N- número de isolados do grupo Hc; (mm)- milímetros; CAZ - ceftazidima (30µg); CAZ/AC- Cefotaxima (10µg) associada ao ácido clavulânico (1µg); CTX - cefotaxima (30µg); CTX/AC- cefotaxima (10µg) associada ao ácido clavulânico (1µg).

a- $p=0,008$ - dados estatisticamente significativos ($p<0,05$) – (mediana=0mm <5>17mm);

b- $p<0,001$ - dados estatisticamente significativos ($p<0,05$) – (mediana=6mm <13>21mm).

4.3.3.2- Detecção de ESBL com Etest^(R)

O teste confirmatório da produção de enzimas ESBL, por parte dos isolados de *K.pneumoniae* dos grupos Hi e Hc, através do método de detecção por Etest^(R), foi realizado apenas para esclarecer as dúvidas existentes entre os resultados dos testes de microdiluição e o DDS, apresentados pelos isolados Hi 13, Hc 21 e Hc 15, os quais mostraram dois morfotipos coloniais diferentes. O Etest® confirmou as avaliações anteriores de positividade para ESBL apresentadas pelas colônias mucóides lactose positiva de cada isolado e DDS negativo para as colônias não mucóides lactose negativas. Confirmou ainda, a resistência ao antimicrobiano

ceftazidima (CAZ) por parte do isolado Hc 15. A **Figura 6** é representativa de um resultado positivo para a produção de ESBL através do Etest®.

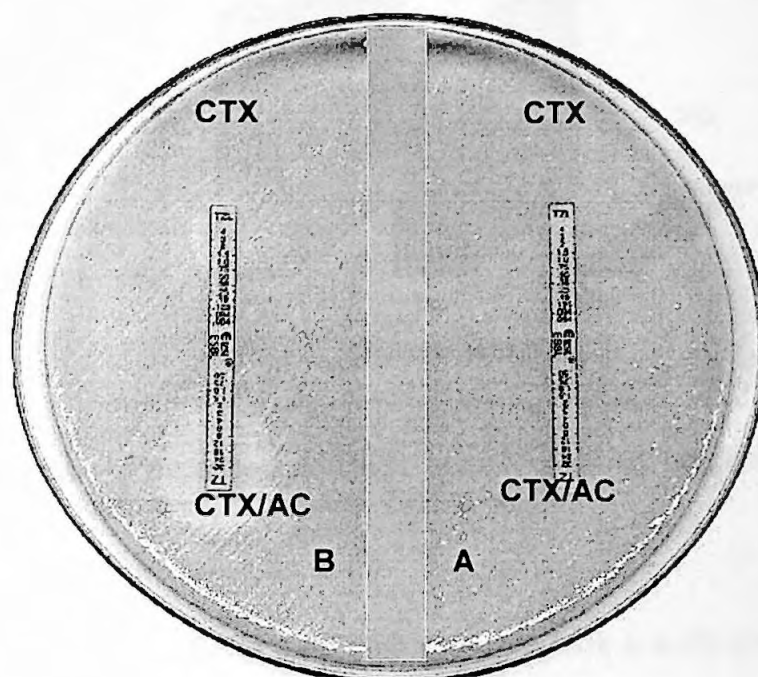


Figura 5- Produção de ESBL demonstrada pelo método de Etest®.

As fitas contêm concentrações gradativas de cefalosporina isolada na extremidade superior e cefalosporina associada ao ácido clavulânico na extremidade inferior, com diferença na CIM $\geq 2\mu\text{g/mL}$.

Figura A - teste negativo; Figura B - teste positivo para produção de ESBL.

CTX – cefotaxima; CTX/AC – cefotaxima/ ácido clavulânico

Após análise dos métodos fenotípicos, os isolados hospitalares Hi e Hc apresentaram 72% e 52% de produção de ESBL, respectivamente. Esses dados estão demonstrados na **Figura 6**.

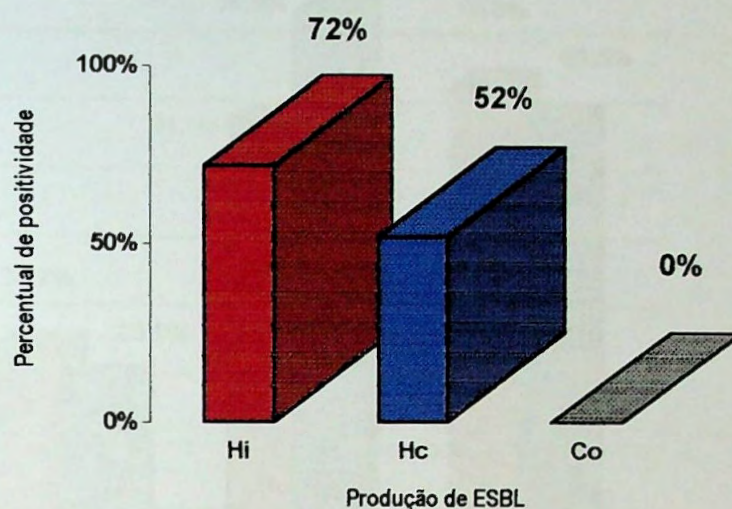


Figura 6 – Percentual de ESBL positivo para os isolados dos grupos Hi e Hc, com base nos testes DDS e MCD.

4.4- Padrão de resistência para aminoglicosídeos e sulfa entre isolados de *K.pneumoniae* produtores de ESBL

Os isolados de *K.pneumoniae* dos grupos Hi e Hc, produtores de ESBL, demonstraram um padrão de resistência frente aos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos e sulfa, sendo da ordem de: 27,7%, 61,1% e 66,5% para amicacina, gentamicina e sulfametoxazol / trimetoprim, respectivamente, para as amostras do grupo Hi. Os isolados do grupo Hc mostraram resistência de 22,0%, 76,9% e 61,5% para amicacina, gentamicina e sulfametoxazol / trimetoprim, respectivamente. Os dados estão apresentados na **Figura 7**.

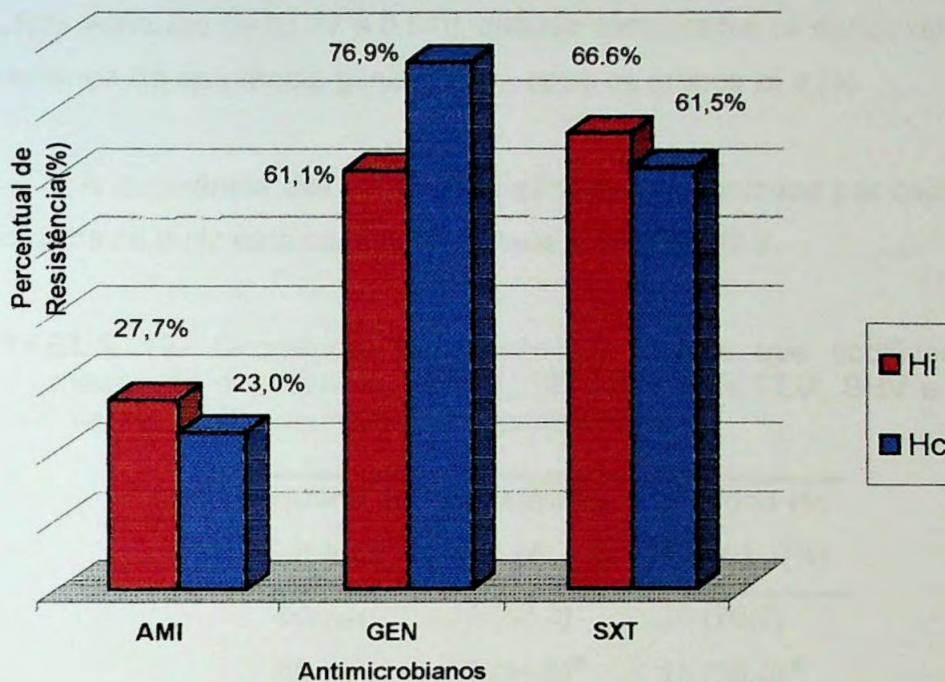


Figura 7 – Percentual de resistência de *K.pneumoniae* frente aos aminoglicosídeos e sulfametoxazol/trimetoprim, observado entre os isolados Hi e Hc produtores de ESBL. AMI- amicacina; GEN- gentamicina; SXT- sulfametoxazol/trimetoprim.

4.5 - Análise molecular da produção de enzimas ESBL.

Os resultados da pesquisa de seqüências gênicas *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} relacionadas à produção de ESBL dos tipos TEM, SHV e CTX-M, respectivamente, para as 31 amostras dos grupos Hi e Hc que apresentaram positividade nos testes fenotípicos, estão contidos na **Tabela 12**.

Dentre os 18 isolados Hi, 15 amostras (83,3%) apresentaram-se positivas para os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} simultaneamente, enquanto que 3 amostras (16,6%) foram positivas para os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}, simultaneamente. Com relação aos 13 isolados Hc, 10 amostras (76,9%) foram positivas simultaneamente, para os três genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e

*bla*_{CTX-M}. Houve significância estatística com [$p=0,03$ com OR de 0,16 e IC95% variando de 0,077 a 0,54)], quando comparados os dados referentes à presença da seqüência gênica *bla*_{SHV} entre os grupos Hi e Hc.

A ocorrência das seqüências gênicas apresentadas por cada um dos isolados Hi e Hc está contida na **Tabela 1 do ANEXO V**.

TABELA 12- Ocorrência de seqüências gênicas que codificam beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) dos tipos TEM, SHV e CTX-M, em isolados de *K. pneumoniae* dos grupos Hi e Hc.

Seqüências Gênicas	Isolados Hi N ^o = 18 (%)	Isolados Hc N ^o = 13 (%)
<i>bla</i> _{TEM}	15 (83,3)	10 (76,9)
<i>bla</i> _{SHV}	3 (16,6) ^a	10 (76,9) ^a
<i>bla</i> _{CTX-M}	16 (88,8)	12 (92,3)

N^o- número de isolados para cada grupo.

a- $p=0,03$ – dados estatisticamente significativos ($p<0,05$)

4.5.1 – Associação de genes codificadores de tipos de ESBL entre os isolados hospitalares de *K.pneumoniae*

Analisando-se os isolados hospitalares de *K.pneumoniae*, quanto à presença de mais de um gene codificador de tipos de ESBL, verificou-se que 3 (16,6%) das amostras do grupo Hi e 10 (76,9%) das amostras do grupo Hc, respectivamente, apresentaram os genes *bla*_{TEM} + *bla*_{SHV}+ *bla*_{CTX-M}, simultaneamente. Houve diferença estatisticamente significativa com [$p=0,03$, OR de 0,16 e IC95% variando de 0,077 a 0,54)], quando comparados os dois grupos de isolados. Tais dados estão demonstrados na **Tabela 13**.

TABELA 13- Associação das seqüências gênicas que codificam ESBL dos tipos TEM, SHV e CTX-M, entre os isolados de *K. pneumoniae* dos grupos Hi e Hc.

Seqüências gênicas	Isolados Hi	Isolados Hc
	N ^o = 18	N ^o = 13
	N (%)	N (%)
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV}	3 (16,6) ^a	10 (76,9) ^a
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M}	15 (83,3)	10 (76,9)
<i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{CTX-M}	3 (16,6) ^b	11 (84,6) ^b
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{CTX-M}	3 (16,6) ^c	10 (76,9) ^c

N^o - número de isolados para cada grupo.

a e c – $p=0,03$ – dados estatisticamente significativos ($p<0,05$)

b – $p=0,009$ – dados estatisticamente significativos ($p<0,05$).

As amostras de *K.pneumoniae* pertencentes aos grupos Hi, Hc e Co, apresentaram perfil plasmidial distintos entre si. A massa molecular dos plasmídios dos isolados Hi variou de 118 a 34MDa. Várias amostras apresentaram 2 ou mais plasmídios de alto peso molecular. A **Figura 8** é representativa do perfil plasmidial do grupo Hi.

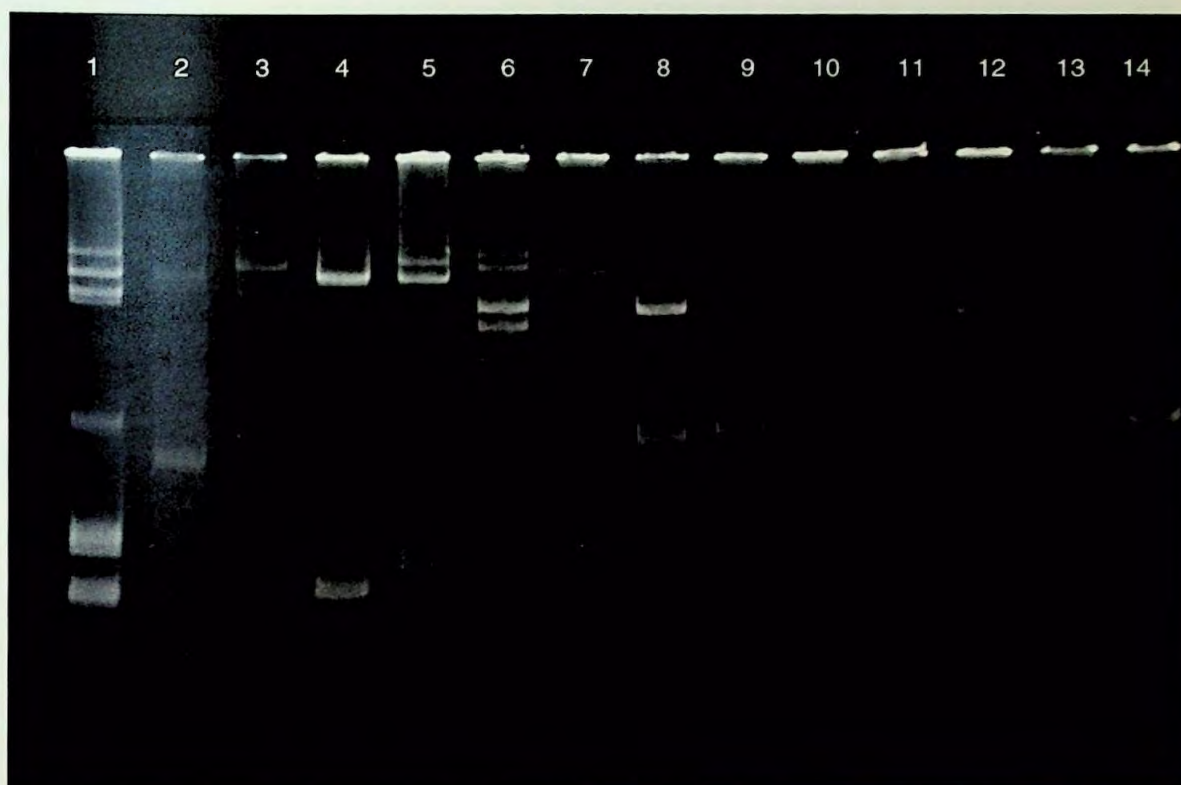


Figura 8- Figura representativa do perfil plasmidial de isolados Hi obtidos de cepas de *K.pneumoniae*, provenientes de diferentes materiais clínicos.

1 a 10 – isolados de *K.pneumoniae* contendo plasmídios com massa molecular aproximada: 1-Hi 1(118,110 e 55MDa); 2-Hi 5(102MDa); 3-Hi 9(105, 70 e 42MDa); 4-Hi 8(74MDa); 5-Hi 11(109 e 102MDa); 6-Hi 13(118, 102, 48 e 42MDa); 7-Hi 44 (100MDa); 8-Hi 29(34MDa); 9-Hi 34(109MDa); 10-Hi 41(102 e 66MDa).

11 a 14- plasmídios referenciais com massa molecular conhecida: 11-pSa (23MDa); 12-RP4 (34MDa); 13-JPN11(66MDa) e 14-R27(110MDa), respectivamente.

Os plasmídios apresentados pelos isolados do grupo Hc, também foram distintos entre si, com massa molecular que variou de 118 a 36MDa. Nenhuma amostra do grupo Hc deixou de apresentar um ou mais plasmídios, os quais estão representados pela **Figura 9**.

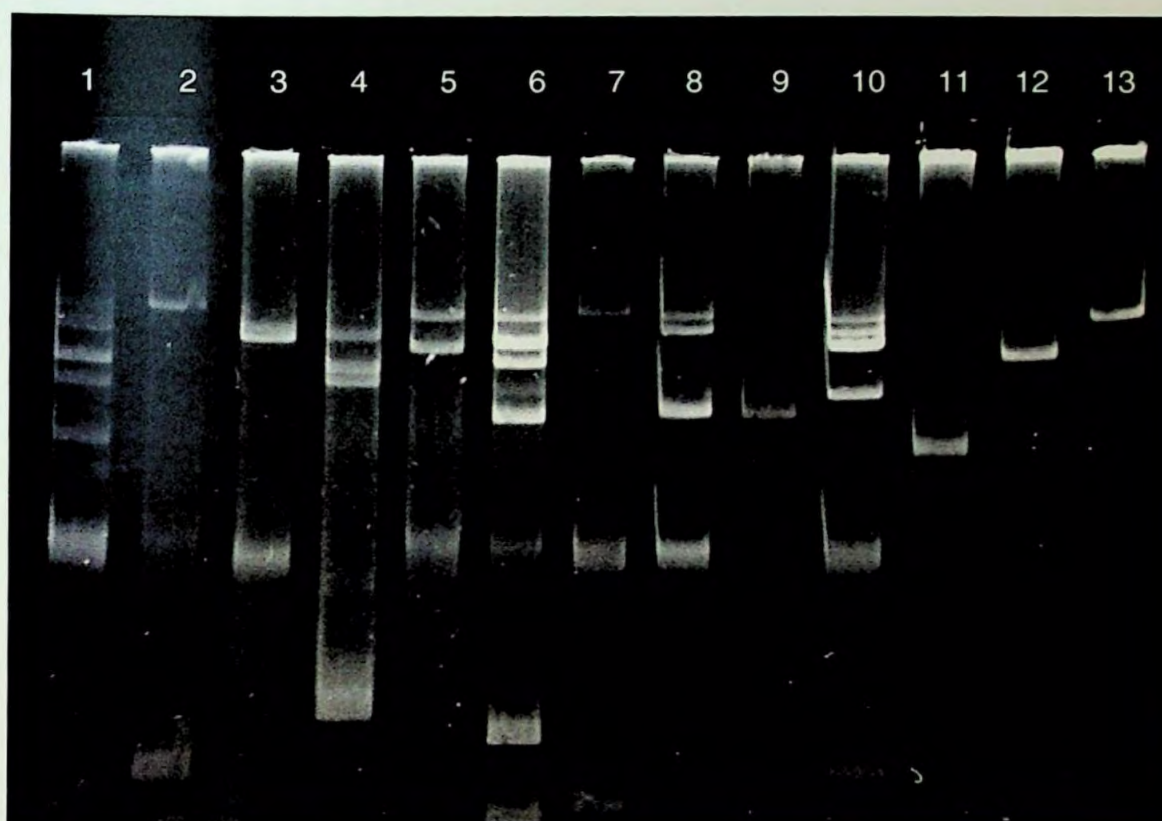


Figura 9- Figura representativa do perfil plasmidial de isolados Hc obtidos de cepas de *K.pneumoniae*, provenientes de diferentes materiais clínicos.

1 a 10 – isolados de *K.pneumoniae* com massa molecular aproximada: 1-Hc 3 (115, 92, 63, 55 e 36MDa); 2-Hc 6(118MDa); 3-Hc 9 (81MDa); 4-Hc 23(86, 63 e 55MDa); 5-Hc 20 (118 e 86 MDa); 6-Hc 15 (118, 86, 63, 55 e 45MDa); 7-Hc 18 (118MDa); 8-Hc 25 (118, 104 e 45MDa); 9-Hc 24 (45MDa); 10-Hc 21 (118, 102, 81 e 55MDa).

11 a 13- plasmídios referenciais com massa molecular aproximada: 11-pSa (23MDa); 12-JPN11(66MDa) e 13-R27 (110MDa), respectivamente.

O perfil plasmidial dos isolados Co, demonstrados na **Figura 10**, foi variado, com massa molecular estimada que oscilou entre 117 a 29MDa. Dos 25 isolados obtidos de fezes de pessoas da comunidade, três amostras (12%) não apresentaram nenhum plasmídio.

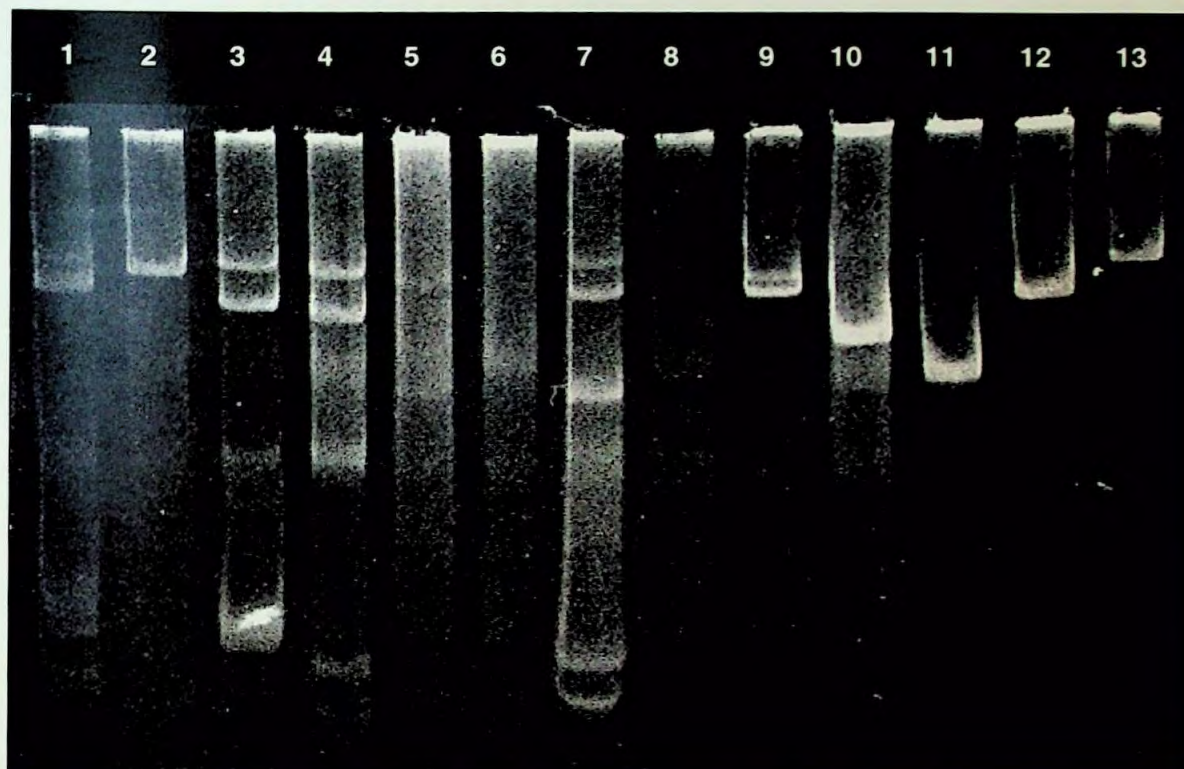


Figura 10- Figura representativa do perfil plasmidial de isolados Co obtidos de cepas de *K.pneumoniae*, provenientes de fezes de indivíduos saudáveis. 1 a 10 – isolados de *K.pneumoniae* que apresentam plasmídios com massa molecular aproximada: 1-Co 4 (117 e 91MDa); 2-Co 7 (100MDa); 3-Co 47 (108 e 102MDa); 4-Co 69 (100 e 61MDa); 5-Co 74 (92MDa); 6-Co 91(nenhum plasmídio); 7-Co 99 (109, 83 e 29MDa); 8-Co 111 (nenhum plasmídio); 9-Co 112 (100 e 83MDa); 10-Co 120 (41MDa). 11 a 13- plasmídios referenciais com massa molecular aproximada: 11-pSa (23MDa); 12-JPN11 (66MDa) e 13-R27 (110MDa), respectivamente.

4.7 – Fatores de Virulência

Seqüências gênicas relacionadas aos genes de virulência *fimA* e *fimH* (*pilus* tipo 1), *iutA* (receptor de membrana para aerobactina), *kpsII* (cápsula do sorotipo K2 de *Klebsiella* sp.), *mrkA* e *mrkD* (fimbria tipo 3 de *Klebsiella* sp.), foram pesquisadas nos isolados de *K.pneumoniae*, utilizando-se seqüências de oligonucleotídeos como iniciadores da PCR. Na Tabela 14 estão descritos os percentuais das seqüências gênicas relacionadas aos fatores de virulência entre amostras de *K.pneumoniae* dos grupos Hi, Hc e Co. Os resultados de cada isolado em particular estão apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3 do ANEXO VI.

TABELA 14 – Ocorrência de seqüências gênicas relacionadas aos fatores de virulência entre amostras de *K.pneumoniae* dos grupos Hi, Hc e Co.

Seqüências Gênicas	Fatores de virulência	Hi	Hc	Co
		(N=25) [#] Nº (%)	(N=25) Nº (%)	(N=25) Nº (%)
<i>iutA</i>	Receptor p/ Aerobactina	19 (76) ^a	13 (52)	10 (40) ^a
<i>fimA</i>	Pilina fimbria tipo I	22 (88)	19 (76)	17 (68)
<i>fimH</i>	Adesina fimbria tipo I	15 (60)	13 (52)	12 (48)
<i>mrkA</i>	Pilina Fimbria tipo 3	24 (96)	24 (96)	19 (76)
<i>mrkD</i>	Adesina Fimbria tipo 3	21 (84) ^b	21 (84) ^c	11 (44) ^{b,c}
<i>kpsII</i>	Cápsula sorotipo K2	2 (8)	2 (8)	0 (0)

N - número de isolados em cada grupo de amostras

a - $p=0,022$ - percentuais estatisticamente significativos ($p<0,05$)

b,c - $p=0,008$ - percentuais estatisticamente significativos ($p<0,05$).

4.7.1- Investigação da seqüência gênica *iutA*

A seqüência gênica heteróloga (de *E.coli*), que codifica para o receptor de membrana do sideróforo aerobactina, foi determinada em (19) 76% das amostras de *K.pneumoniae* do grupo Hi, em (13) 52% dos isolados do grupo Hc e em (10) 40% das amostras Co investigadas. A análise

estatística através do teste de *Qui quadrado* (X^2) mostrou diferença significativa entre os percentuais demonstrados pelos grupos Hi e Co, com $p=0,022$, [OR de 4,75; (IC95% variando de 1,41 a 16,05)].

4.7.2- Determinação das seqüências gênicas *fimA* e *fimH*

A seqüência gênica *fimA*, que representa a pilina da fímbria tipo 1 de *K.pneumoniae*, esteve presente em (22) 88% das amostras do grupo Hi, em (19) 76% das amostras Hc e em (11) 44% dos isolados Co. Enquanto que a adesina *fimH* do *pilus* tipo 1 de *K.pneumoniae* foi observada em (15) 60% das amostras Hi, em (13) 52% das amostras Hc e em (12) 48% das amostras Co, investigadas através da técnica de PCR. Não houve diferença estatística significativa entre os resultados obtidos.

Observou-se que 60%, 52% e 48% das amostras dos grupos Hi, Hc e Co, respectivamente, demonstraram genes que codificavam tanto para a pilina (*fimA*), quanto para a adesina (*fimH*) da fímbria tipo 1, não havendo diferença estatística entre os grupos estudados.

4.7.3- Determinação das seqüências gênicas *mrkA* e *mrkD*

O gene *mrkA*, que codifica a pilina da fímbria tipo 3, foi detectado em (24) 96% de *K.pneumoniae* que compõem o grupo de amostras Hi, em (22) 92% dos isolados do grupo Hc e em (19) 76% das amostras do grupo Co pesquisadas. Não houve diferença estatística entre os resultados obtidos.

Da mesma forma, o gene *mrkD*, que codifica adesina da fímbria tipo 3 de *K.pneumoniae* foi detectados em (21) 84% dos isolados Hi e Hc, enquanto que nos isolados do grupo Co foi observado em (11) 44% dos isolados investigados. Os dados analisados, através do teste de *Qui quadrado* (X^2), mostraram que houve diferença estatística entre os resultados apresentados pelos grupos Hi e Hc, quando comparados aos

dados do grupo Co, com $p=0,008$, [OR de 6,68; (IC95% variando de 1,77 a 25,250)].

Observou-se ainda que, 84%, 84% e 44% das amostras dos grupos Hi, Hc e Co, respectivamente, demonstraram genes que codificavam tanto para a pilina (*mrkA*), quanto para a adesina (*mrkD*) da fimbria tipo 3. Os dados apresentados foram estatisticamente significativos entre os grupos Hi x Co, e Hc x Co estudados, com [$p=0,008$, OR = 6.68; (IC95% variando de 1,77 a 25,25)].

4.7.4- Determinação da seqüência gênica *kpsII*

O gene *kpsII*, que codifica a cápsula do sorotipo K2 do gênero *Klebsiella*, mostrou-se positivo em 8% das amostras Hi e amostras Hc, não sendo detectado em nenhuma amostra do grupo Co.

4.8- Associação de genes de virulência entre os isolados de *K.pneumoniae*.

Analisando-se os isolados de *K.pneumoniae*, quanto à presença de mais de um gene de virulência, verificou-se que (14) 56% das amostras do grupo Hi, (8) 32% dos isolados Hc e (2) 12% das amostras do grupo Co, apresentaram os genes *fimA* + *fimH* + *iutA*, simultaneamente. Os percentuais demonstrados pelas amostras dos grupos Hi, quando comparados aos percentuais do grupo Co, foram estatisticamente significativos, com $p= 0,002$, [OR= 9,33; (IC95% variando de 2,20 a 39,47)].

Da mesma forma, observou-se que os isolados de *K.pneumoniae* do grupo Hi, apresentaram os genes *fimA* + *fimH* + *mrkA* + *mrkD*, simultaneamente, em (14) 56%. Os isolados do grupo Hc em (11) 44%, enquanto que as amostras do grupo Co foram positivas para os referidos genes em (3) 12%. Feita a análise estatística, houve significância entre os

valores apresentados pelo grupo Hi, quando comparados ao grupo Co, com $p= 0,042$, [OR = 4,03; (IC variando de 1,20 a 13,28)].

Igualmente foram investigados os percentuais apresentados pelos isolados de *K.pneumoniae* para as seqüências gênicas *fimA* + *fimH* + *mrkA* + *mrkD* + *iutA*, apresentadas simultaneamente. As amostras do grupo Hi mostraram (14) 56% de positividade para o conjunto de genes, enquanto que as amostras dos grupos Hc e Co foram positivas em (7) 28% e (1) 4%, respectivamente. Os dados observados mostraram-se estatisticamente significativos quando comparados os valores apresentados pelos grupos Hi e Co, com $p < 0,001$, com [OR = 30,54 (IC variando entre 3,55 a 262,53)].

A associação entre os genes de virulência apresentados pelos isolados de *K. pneumoniae* encontra-se disposta na **Tabela 15**.

Tabela 15- Associação entre os fatores de virulência apresentados pelos isolados de *K.pneumoniae* oriundos dos grupos Hi, Hc e Co, pela análise da PCR.

Genes de virulência	Hi (N=25) Nº. (%)	Hc N=25 Nº. (%)	Co N=25 Nº. (%)
<i>fimA/ fimH</i>	15 (60%)	13 (52%)	12 (48%)
<i>mrkA/ mrkD</i>	21 (84%) ^a	21 (84%) ^b	11 (44%) ^{a,b} $p=0,008$
<i>fimA/ fimH/ iutA</i>	14 (56%) ^c	8 (32%)	3 (12%) ^c $p=0,002$
<i>fimA/ fimH/ mrkA/ mrkD</i>	14 (56%) ^d	11 (44%)	6 (24%) ^d $p=0,042$
<i>fimA/ fimH/ mrkA/ mrkD/ iutA</i>	14 (56%) ^e	7 (28%)	1 (4%) ^e $p<0,001$

N - número de isolados em cada grupo de amostras

^{a,b,c,d,e} - (a- $p=0,008$; b- $p=0,008$; c- $p=0,002$; d- $p=0,043$; e- $p<0,001$)- dados estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

K. pneumoniae está entre as espécies mais freqüentemente implicadas em infecções hospitalares, tendo sido responsabilizada por cerca de 3 a 7% de todas as infecções nosocomiais, sem variações geográficas quanto à sua prevalência (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

Observa-se uma alta prevalência de *K.pneumoniae* em infecções do trato urinário, embora também seja encontrada com freqüência como causa de sepses, pneumonia e infecções de sítios cirúrgicos. *K.pneumoniae* é o segundo agente entre as enterobactérias causadoras de bacteremia associadas à inserção de cateter, com taxa geral de mortalidade que varia de 20 a 55% (BONTEN e WEINSTEINS, 1996).

Estudos longitudinais de vigilância do programa SENTRY (1998-1999), realizados em centros da América Latina (América do Sul e México), mostram *K.pneumoniae* como o quinto (6,3%) agente mais isolado em bacteremias (SADER et al, 1999), o terceiro (12%) entre os isolados de infecções do trato respiratório inferior e o segundo em infecções urinárias (SADER et al, 2001). No Brasil, em três centros médicos, *Klebsiella* sp. mostrou-se como o terceiro agente mais freqüente em infecções do trato urinário, o quarto, em trato respiratório inferior e bacteremias e o quinto em infecções de partes moles, dentre o total de isolados clínicos hospitalares analisados (SADER et al, 1999).

Diversos fatores são considerados de risco para quadros infecciosos por *K.pneumoniae* no paciente hospitalizado. Embora infecções por *K.pneumoniae* possam ser diagnosticadas em qualquer idade, recém-nascidos e idosos estão mais predispostos a processos infecciosos. Da mesma forma, doenças de base como diabetes, neoplasias e infecções crônicas como o alcoolismo e doença pulmonar obstrutiva crônica, predispõem o paciente ao risco de infecção por *K.pneumoniae*. Além disso,

associado ou não a outros fatores, o uso prévio de agentes antimicrobianos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, são os fatores de risco mais freqüentemente descritos em relação às infecções por esse microrganismo (BONTEN e WEINSTEINS, 1996; SIU et al, 1999).

A amostragem analisada, no presente estudo, consistiu de isolados de *K.pneumoniae* oriundos de pacientes de ambos os sexos, com distribuição eqüitativa dentro dos grupos. A faixa etária variou de recém-nascidos a idosos, em todos os grupos analisados, por escolha metodológica. No entanto, dentre os 50 pacientes hospitalizados (grupos Hi e Hc), quase a metade dos mesmos, 23 (46%) encontrava-se internada em UTI (neonatal, pediátrica e adultos), sendo que destes, 73,9% estavam apenas colonizados e 26,1% eram portadores de infecção. Diante destes dados, pode-se supor que a internação em UTI, por si só, não constitui fator de risco isolado, uma vez que outros fatores devem estar associados, como por exemplo, a idade e a doença de base portada pelo paciente, assim como o nível de colonização por *K.pneumoniae* e o uso prévio de antimicrobianos.

Quanto aos biotipos apresentados por *K.pneumoniae* e relatados neste estudo, o biotipo II, resistente a cefalotina, foi o mais observado (48%) no grupo de isolados Hi, com significância estatística ($p=0,004$), enquanto que o grupo de amostras Hc apresentou tanto o biotipo I (cefalotina sensível), com 36%, quanto o biotipo II com 32% dos isolados. Já o grupo de amostras Co, teve a maioria (44%) dos isolados dentro do biotipo I, resultado estatisticamente significativo ($p=0,009$) e compatível com o perfil de sensibilidade apresentado pelas 25 amostras estudadas. Estes dados sugerem que se pode utilizar a cefalotina como marcador de isolados de *K.pneumoniae* que apresentam um padrão de resistência mais pronunciado, servindo de alerta para as comissões de controle de infecção hospitalar monitorarem estas cepas, a fim de se evitar surtos de infecção hospitalar nas unidades cirúrgicas, bem como de internação.

Quanto ao perfil de sensibilidade dos isolados estudados, notou-se que *K.pneumoniae* dos grupos Hi e Hc mostraram-se resistentes as cefalosporinas de maneira geral. Frente às cefalosporinas de terceira geração, *K.pneumoniae* dos grupos hospitalares foram sensíveis em apenas 36% para cefotaxima, cefpodoxima e ceftazidima, 48% para ceftriaxona, contra 100% de sensibilidade das amostras Co para os mesmos antimicrobianos. Estes resultados estão de acordo com os descritos por Gales e colaboradores (1997), que analisando cepas de *K.pneumoniae*, obtidas de hospitais de São Paulo e do Rio de Janeiro, observaram os seguintes percentuais de sensibilidade para os antimicrobianos em referência: 52,8% para cefotaxima; 36,1% para ceftazidima e 38,9% para ceftriaxona.

Variações nos percentuais de sensibilidade de amostras hospitalares estão sob a influência de diversos fatores intrínsecos a cada instituição. No entanto, o uso intensivo de beta-lactâmicos possibilita o surgimento e a evolução de diversos mecanismos de resistência contra esta classe de antimicrobianos, tais como: alteração na permeabilidade do envoltório da bactéria ao antimicrobiano; efluxo ativo; alteração conformacional e bioquímica do sítio alvo na parede celular; surgimento de vias secundárias de síntese, e/ou inativação enzimática, dependendo do antimicrobiano utilizado. (SANDERS e SANDERS, 1997, LIVERMORE, 1998).

Um dos mecanismos de resistência mais utilizados pelas bactérias Gram-negativas, dentre elas *K.pneumoniae*, é a produção de enzimas que hidrolisam antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, as chamadas beta-lactamases (JACOBY e MEDEIROS, 1991; LIVERMORE, 1995) Tais enzimas variam em especificidade e multiplicidade quanto a seus substratos, sendo tanto mais evidenciadas na medida que esses substratos sejam utilizados na prática clínica de instituições hospitalares, especificamente, ou na comunidade como um todo.

A diminuição da sensibilidade de microrganismos gram-negativos frente aos beta lactamicos, é consequência da seleção de bactérias que produzem beta lactamases. Este aumento no nível de resistência é próprio da disseminação de plasmídios autotransferíveis, que codificam fenótipos de múltipla- resistência (HERITAGE et al, 1999). A pressão de seleção promovida pelo uso de cefalosporinas de terceira geração, parece ter maior importância no início do processo de colonização do trato gastrintestinal e trato respiratório de pacientes que, mais tarde, podem desenvolver infecções por cepas de *K.pneumoniae* resistentes (MEDEIROS, 1997). Esta situação talvez seja justificada pelo fato de serem microrganismos hábeis em carrear plasmídios de resistência e virulência e de resistirem, também, à dessecação em superfícies, no ambiente e na pele (LIVERMORE, 1995; LIVERMORE, 1998; PODSCHUN e ULLMANN, 1998;).

A maioria dos bacilos Gram-negativos produz algum tipo de beta-lactamase de maneira constitutiva. Entretanto, muitas vezes, esta produção se dá em concentrações tão baixas que não são capazes de expressar o caráter fenotípico de resistência. Dentre as beta-lactamases produzidas por microrganismos entéricos Gram-negativos, as TEM-1, TEM-2 e SHV-1 com suas derivadas ESBL, constituem o principal mecanismo de resistência a esses antibióticos. (LIVERMORE, 1998; BLAZQUEZ et al, 2000).

As ESBL são enzimas que conferem resistência aos beta-lactâmicos, tais como: cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona e ao monobactâmico aztreonam, mas não atuam sobre as cefamicinas e carbapenêmicos. Nos primeiros casos descritos, as cepas produtoras de ESBL eram de pacientes internados principalmente em UTI e as enzimas codificadas em pequenos plasmídios que não associavam outros mecanismos de resistência (MEDEIROS, 1997). Atualmente estas cepas são encontradas em diferentes unidades hospitalares como geriatria, pediatria, neonatologia, unidades de transplantados e unidades oncológicas, bem como, fora do ambiente hospitalar, principalmente em serviços de instituições fechadas ou em pacientes com infecções crônicas atendidos no domicílio (SIU et al, 1999).

Nos dias atuais, a codificação da resistência tem sido observada em plasmídios portadores de alta massa molecular, onde, normalmente, está associada a outros mecanismos, como a produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, as diidrofolato redutase (que conferem resistência às sulfonamidas), resistência à tetraciclina, ao cloranfenicol e às fluoroquinolonas. Assim, isolados de *Klebsiella* sp., resistentes às cefalosporinas de terceira geração, costumam ser, também, menos sensíveis às outras classes de antimicrobianos (EISEN et al, 1995; HANSON et al, 1999; QUINN, 2001; NATHISUWAN, 2001).

Dentre os aminoglicosídeos avaliados no presente estudo, a amicacina mostrou percentuais mais sensíveis que a gentamicina nos isolados hospitalares investigados. Do mesmo modo, os percentuais demonstrados por estas mesmas amostras, frente à associação sulfametoxazol/ trimetoprim, também foram menos sensíveis.

A distribuição do perfil de sensibilidade destas drogas entre os grupos hospitalares estudados, acompanha a distribuição das ESBL. Embora não se tenha realizado estudo relacionando o perfil plasmidial com resistência, os dados encontrados corroboram para a existência de associação de mecanismos em um mesmo elemento genético. Itokazu e colaboradores (1996) demonstraram a elevada taxa de resistência frente aos aminoglicosídeos (73%) e quinolonas (52%), em uma população produtora de ESBL, enquanto que nas cepas não produtoras, a resistência a estes grupos não passou de 5%. No presente estudo, o percentual de resistência para ciprofloxacina, apresentado por *K.pneumoniae* produtora de ESBL, foi da ordem de 44% no grupo Hi e de 38,4% para o grupo Hc. Os isolados hospitalares deste estudo, não produtores de ESBL, não apresentaram nenhuma resistência a ciprofloxacina.

No presente estudo pode-se observar ainda, que os 31 (18Hi + 13Hc) isolados hospitalares de *K.pneumoniae*, produtores de ESBL, mostraram alta

taxa de resistência frente as cefalosporinas de terceira geração, aos aminoglicosídeos, principalmente gentamicina, assim como para sulfas, corroborando os achados de EISEN et al, 1995; HANSON et al, 1999; QUINN, 2001; NATHISUWAN, 2001.

Segundo dados obtidos pelo Programa SENTRY de vigilância em antimicrobianos (SADER et al, 2001), nos anos de 1998 a 1999, avaliou-se a relevância clínica dos isolados de *K. pneumoniae* provenientes de infecções hospitalares e o impacto da resistência mediada por enzimas ESBL nesta população. Foram testadas 3.728 cepas isoladas de infecções hospitalares de três centros médicos brasileiros: Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Porto Alegre; Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC/EPM)- São Paulo, e Laboratório Santa Luzia - Santa Catarina. Foram isoladas *K. pneumoniae* e produtoras de ESBL em 8,5% dos casos.

Ainda de acordo com os estudos do programa SENTRY (SADER et al, 2001), *K.pneumoniae* portador de ESBL é mostrado como o segundo microrganismo (28%) causador de infecções urinárias; o terceiro (12%) entre os isolados clínicos de infecções do trato respiratório inferior e o quinto agente (6,3%) mais freqüentemente isolado em bacteremias hospitalares (SADER et al, 2001).

Da mesma forma, o programa *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection* (MYSTIC) avaliou, no Brasil, a atividade de nove agentes antimicrobianos, utilizando tiras de Etest/ ESBL, frente às cepas obtidas de pacientes internados em UTI. Mendes e colaboradores (2000), estudaram 176 amostras de enterobactérias quanto à produção de ESBL e a maior prevalência foi registrada entre os isolados de *K. pneumoniae* (59,2%), seguida por *Enterobacter* sp. (19,5%) e *E.coli* (14,6%).

Na América Latina, o programa de vigilância de resistência, RESISNET, utilizando ceftriaxona para triagem das amostras produtoras de

ESBL, detectou alta prevalência de *K.pneumoniae* ESBL positiva nos países estudados, tais como: 57% na Argentina; 38% no Brasil; 73% no Chile; 44% na Colômbia; 32% na Costa Rica; 26% no Equador; 52% na Guatemala, 56% no México, 38% no Uruguai e 63% na Venezuela (SIFUENTES-OSORNIO, 2000).

No período de 1997 a 1999, o Hospital e Maternidade Alexander Fleming, no Rio de Janeiro, apresentou a taxa de 22,9% de infecção hospitalar causada por *K.pneumoniae* e destes isolados, 60,9% era produtor de ESBL (MARTINS-LOUREIRO et al, 2001). No mesmo período, no Hospital da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, foi realizado um estudo sobre os fatores de risco de um surto ocorrido com neonatos internados em UTI-Neo, onde 53,8% das infecções foram devidas a *K. pneumoniae* produtoras de ESBL (PESSOA-SILVA et al, 2003).

No Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (HURNP), *K.pneumoniae* produtora de ESBL foi responsável por 36,4% das infecções em pacientes ambulatoriais e internados, no ano de 2000 (BARBOSA et al, 2000). Segundo dados da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) referentes a *K.pneumoniae* produtoras de ESBL, no HURNP, durante o ano de 2000, a incidência foi de 30,8%; 23,8% em 2001 e 30,2% em 2002, dos casos de infecção em pacientes internados, nos respectivos períodos (CAVASSIN et al, 2002).

Embora o presente estudo não tenha como objetivo determinar a prevalência de *K.pneumoniae* produtora de ESBL, dentro do HURNP, pode-se observar que os resultados obtidos junto às amostras hospitalares, demonstraram a significativa ocorrência dessas enzimas. Neste, 72% dos isolados de pacientes com infecção e 52% dos isolados de *K.pneumoniae* colonizantes, eram produtores de ESBL. Entretanto, *K.pneumoniae* obtidas

junto à comunidade extra-hospitalar, apresentaram testes fenotípicos e moleculares negativos para a produção de ESBL.

As opções para tratamento são restritas frente às cepas produtoras de ESBL, estando contra-indicadas as cefalosporinas de terceira geração e cefepime, ainda que sensíveis no teste *in vitro*, pois podem conduzir à falha terapêutica pela resistência ampliada (NATHISUWAN, 2001). A substituição de cefalosporinas por associações com inibidores de beta-lactamases, pode ter um efeito protetor no surgimento de ESBL em ambiente hospitalar, além da possibilidade de utilização de carbapenêmicos como terapia de escolha (QUINN, 2001).

Desta maneira, a emergência de isolados produtores de ESBL tem promovido importantes implicações clínicas, epidemiológicas e terapêuticas, passando pela gravidade dos quadros infecciosos em pacientes debilitados, pela sua capacidade de disseminação da resistência através de elementos genéticos móveis e pela limitação terapêutica, com o uso de antimicrobianos mais potentes e de maior custo.

De um modo geral, o poder de seleção do antimicrobiano utilizado, a localização do sítio infeccioso, a condição imune do paciente tratado e a dimensão do inóculo bacteriano são fatores que, quando associados, podem elevar as taxas de falha terapêutica com cefalosporinas. Este fenômeno ocorre principalmente em pacientes neutropênicos, em quadros de pneumonia (JONES, KUGLER e PFALLER, 1999) e entre portadores de fibrose cística (PITOUT et al, 1997).

As ESBL são, caracteristicamente, enzimas que destroem grande parte dos beta-lactâmicos e, ao mesmo tempo, podem agir sobre alguns substratos preferenciais enquanto não atuam em outros, fato que pode dificultar ainda mais sua detecção. Estão descritos três genes que codificam ESBL (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}). Atualmente existem em torno de 90 derivados TEM, 30 derivados SHV e cerca de 12 derivadas CTX-M

(CASELLAS 2000; BRADFORD; BONNET et al, 2001) . O presente estudo, utilizando iniciadores de regiões conservadas, mostrou a presença de mais de um gene para o mesmo isolado. Observou-se que 83,3% das amostras Hi apresentaram os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} simultaneamente, enquanto que 16,6% apresentaram-se positivas para os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}, simultaneamente. Já os isolados do grupo Hc apresentaram 76,9% de amostras carregando os três genes.

A presença de SHV em *Klebsiella* sp. é, com maior frequência, cromossomal. A beta-lactamase SHV apresenta potencial de hidrólise contra ceftazidima e aztreonam, além de hidrolisar penicilinas. Com as mutações pontuais na seqüência dos aminoácidos, as novas SHV têm ampliado seu espectro de atividade, clivando também cefotaxima, uma cefalosporina de largo espectro, com grande emprego na terapia empírica, inclusive em pacientes hospitalizados (HERITAGE et al, 1999; HOWARD et al, 2002).

A CTX-M-2 tem sido documentada, principalmente, em *K.pneumoniae*, mas também em *E.coli*, *Proteus mirabilis*, *Shigella* sp. *Enterobacter cloacae*., *Morganella morganii* e *Citrobacter freundii* (CASELLAS, 2000). A afinidade das cefotaximases por cefotaxima chega a ser 300 vezes maior que a afinidade por ceftazidima e aztreonam, fato que deve ser lembrado no momento da escolha dos substratos utilizados nos testes de detecção (BONNET et al, 2001; CASELLAS, 2000). Apresentam também sensibilidade ao bloqueio por inibidores de beta-lactamases, preferencialmente por tazobactam. Desse modo, em estudo realizado na Argentina, a CTX-M-2 foi a ESBL mais prevalente, estando presente em 64% dos isolados, seguida por SHV-5 (6%), SHV-2 (5%) e SHV-4 (1%) (CASELLAS, 2000).

Dentre os inúmeros fatores de resistência e virulência relatados para *K.pneumoniae*, o presente estudo teve como objetivo, também, investigar a presença e a massa molecular de plasmídios apresentados por este

microrganismo. Sendo assim, pela análise dos perfis plasmidiais obtidos de *K.pneumoniae* investigados, observou-se que os isolados hospitalares apresentaram um número maior de plasmídios, tanto de pequena quanto de elevada massa molecular, sugerindo que o ambiente hospitalar propicia a troca constante de material genético entre os isolados, o que confere homogeneidade ao perfil de resistência e virulência. Em alguns isolados comunitários observou-se a ausência de plasmídios.

O processo infeccioso depende da eficiência com que o microrganismo consegue colonizar, causar alterações patológicas e se disseminar a um novo sítio ou, a um outro hospedeiro. Para colonizar, o patógeno requer a aquisição de nutrientes essenciais para o seu crescimento e, o ferro é um desses elementos (MIETZNER e MORSE, 1994). O ferro é muito importante para todas as células vivas porque participa de processos bioquímicos e metabólicos, incluindo a transferência de elétrons da cadeia respiratória e a síntese do DNA (GUERINOT, 1994).

Aerobactina é um sistema bacteriano de captação e transporte de ferro, mais eficiente que a enterobactina, que capacita a bactéria a crescer em ambientes pobres em ferro, tais como em urina e soro depletados de complemento (MONTGOMERIE et al, 1984). O receptor para aerobactina em *E.coli* é codificado pelo gene *iutA*, o qual possui regulação dependente de ferro (BINDEREIF e NEILANDS, 1983) e peso molecular de 74kDa (JOHNSON e STEEL, 2000). O receptor homólogo, produzido por *K.pneumoniae*, apresenta peso molecular da ordem de 76kDa (WILLIAMS et al, 1987).

No presente estudo, o gene *iutA*, foi observado com maior prevalência entre os isolados infecciosos. Não foram encontrados dados na literatura sobre a prevalência deste gene em *K.pneumoniae*, porém, há relatos de pequena produção de aerobactina entre as espécies de *Klebsiella* (NASSIF e SANSONETTI, 1986; VERNET et al, 1992; PODSCHUN et al, 1993; VERNET et al, 1995). Estudos adicionais devem ser realizados para

se verificar a expressão de aerobactina, bem como de seu receptor em *K.pneumoniae*.

Tais relatos podem ser devidos ao fato de que, isolados de *K.pneumoniae*, desprovidos de aerobactina, são altamente capazes de usar esse sideróforo introduzido exogenamente, por expressarem receptores *iutA*, da mesma forma que *E.coli* é capaz de utilizar o sideróforo ferricromo, produzido por fungos. Desta maneira, as espécies de *Klebsiella* teriam uma vantagem sobre outros patógenos quando em uma infecção polimicrobiana, pois estariam em condições de captar ferro do ambiente, sem gasto de energia para produzir aerobactina (WILLIAMS et al, 1987).

Considerando-se que os quadros infecciosos ocasionados por *K.pneumoniae* são precedidos pela colonização do hospedeiro, vale ressaltar que a frequência da exposição, bem como o aumento no número de colonizantes pode predispor a instalação da infecção, principalmente frente a desequilíbrios no estado imunológico desse hospedeiro. Sendo assim, condições que permitam ou promovam a colonização, podem ser determinantes no desenvolvimento de infecções hospitalares por este agente (BONTEN e WEINSTEIN, 1996; BOYCE, 1996).

A propriedade de aderência em *Klebsiella*, assim como em outras espécies da família Enterobacteriaceae, pode se dar através de diferentes tipos de fímbrias. Para tanto, a fímbria ou *pili* tipo I, promove a aderência bacteriana manose sensível e específica (PARRY e ROOKE, 1985), bem como a adesão de *K.pneumoniae* às células epiteliais dos tratos respiratório e intestinal (CLEG e GERLACH, 1987; VENEGAS et al, 1995). Esta adesão pode ser a etapa inicial da patogênese das infecções por *K.pneumoniae* nestes tratos (LANGSTRAAT, BOHSE e CLEGG, 2001).

O operon *fim* está localizado no cromossomo e as estruturas da fímbria tipo 1 são bastante conservadas entre os membros da família

Enterobacteriaceae. Ainda assim, existem diversidades estruturais nesta fímbria para os diferentes gêneros desta família (PODSCHUN et al, 1993). A subunidade FimA de *K.pneumoniae* apresenta, 83% de homologia com a seqüência gênica encontrada em *E.coli* uropatogênica, correlacionando a presença da fímbria tipo 1 com cistite e pielonefrite, também em *K.pneumoniae* (SCHEMBRI e KLEMM, 2001).

Avaliando cepas de *K.pneumoniae* associadas com infecção do trato urinário, Tarkkanen e pesquisadores (1992) observaram que 80% delas possuíam fímbria tipo 1. Similarmente, Podschun, Fisher e Ullmann (2000) encontraram a fímbria tipo 1 em 86% dos isolados urinários de *K.pneumoniae*. Hornick e colaboradores (1991), analisando a presença destas adesinas em cepas de secreções traqueais, encontraram 50% das amostras de *K.pneumoniae* apresentando fímbria tipo 1. Da mesma maneira, Podschun e colaboradores (1993), estudando *K.pneumoniae* isoladas do ambiente e da água, obtiveram 79% das amostras expressando a fímbria em questão.

Tentando demonstrar a importância da fímbria tipo 1 em processos infecciosos por *K.pneumoniae* no trato urinário, Fader e Davis (1982) concluíram que a expressão da presença do *pilus* manose sensível, aumentava a habilidade de *K.pneumoniae* infectar a pélvis renal de camundongos. No entanto, Maayan e colaboradores (1985) induziram processo renal agudo em camundongos, utilizando variante de *K.pneumoniae* não fimbriada.

Os genes *fimA* e *fimH* que codificam pilina e adesina da fímbria tipo I de *Klebsiella* sp., respectivamente, foram encontrados em quase todos os isolados examinados neste estudo. Assim, estes genes foram observados em 88 e 60%, dos isolados de origem hospitalar causadores de infecção; em 76 e 52% dos isolados hospitalares que só colonizaram os pacientes, contra

68 e 48% das amostras de *K.pneumoniae* comunitárias, respectivamente. Não havendo diferença estatística entre os diferentes grupos.

Esta ubiquidade, no entanto, não deve ser interpretada como sinal de que os genes *fimA* e *fimH* não apresentam importância na patogênese da infecção por *K.pneumoniae*. Os dados apresentados neste estudo, com ausência de significância estatística entre os diferentes grupos, reforçam que a fímbria tipo 1 em *Klebsiella*, pode não ser um determinante isolado para o desenvolvimento do processo infeccioso nos tratos urinário e respiratório, devendo estar associada a outros fatores de virulência.

Outra adesina fimbriada descrita em *K.pneumoniae* é a fímbria tipo 3 que também é produzida por outros membros da família Enterobacteriaceae, incluindo *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia* e *Serratia* (GERLACH, ALLEN e CLEGG, 1989; CLEGG et al, 1994). A expressão da fímbria tipo 3, em *Klebsiella*, requer a presença de pelo menos seis genes *mrk*, os quais apresentam como subunidade principal a pilina codificada pelo gene *mrkA* e a adesina codificada pelo gene *mrkD*.

Neste estudo, a presença do gene *mrkA* foi observada em 96% dos isolados hospitalares, contra 76% dos isolados comunitários. Similarmente, o gene *mrkD* foi encontrado em 84% dos isolados hospitalares, contra 44% dos isolados da comunidade extra-hospitalar, havendo significância estatística entre os grupos. Estes dados estão de acordo com os achados de Podschun, Fisher e Ullmann (2000), que analisando *K.pneumoniae* de isolados clínicos, observaram que em 70% estavam presentes os genes codificadores da fímbria tipo 3.

A adesina *mrkD*, da fímbria tipo 3, liga-se ao colágeno da face basolateral celular (HORNICK et al, 1995). Tendo em vista as características do receptor da adesina, o dano tecidual favorece a adesão da bactéria via fímbria tipo 3. É provável que isto explique a alta prevalência de infecções

por *K.pneumoniae* nos tratos urinário e respiratório, principalmente após a utilização de sondas. Neste estudo, foi demonstrado que a maioria dos isolados de *K.pneumoniae* possui aparato genético para produzir a pilina MrkA, da fímbria tipo 3, independente da sua origem. No entanto, os isolados hospitalares mostraram-se mais capacitados a produzir a fímbria tipo 3 por apresentarem maior prevalência do gene que codifica a adesina MrkD, conferindo ao microrganismo, maior habilidade de adesão tecidual.

Em *Klebsiella* sp., 77 sorotipos diferentes de antígenos capsulares são descritos na literatura, embora muitas amostras sejam ainda relatadas como não tipadas. Há controvérsias quanto a correlação do tipo sorológico capsular e o sítio anatômico dos processos infecciosos causados por este microrganismo. No entanto, o sorotipo K2 é consenso quanto à virulência e a sua correlação com infecções do trato urinário e respiratório inferior, assim como em infecções sistêmicas (PODSCHUN e ULLMANN, 1998; LAI et al, 2000; TSAY et al, 2002).

Nesta pesquisa, os isolados dos grupos hospitalares demonstraram um padrão colonial predominantemente mucóide, independente do meio de cultura utilizado para inoculação. Esta prevalência (80 e 72%) quando analisados frente aos isolados da comunidade extra-hospitalar (40%), apresentou significância estatística.

A mucosidade das colônias deve estar relacionada ao conteúdo de mucopolissacarídeos capsulares apresentados pelas cepas (ABBOTT, 1999; FAVRE-BONTÉ, JOLY e FORESTIER, 1999). Vale lembrar que a presença da cápsula em *K.pneumoniae* é essencial para sua virulência, pois inibe ou dificulta a ação fagocítica, assim como impede a lise da bactéria pelos componentes C3b do complemento e conseqüentemente, permite que a mesma possa sobreviver frente as barreiras imunológicas do hospedeiro, na condição de colonizante ou infectante de tecidos, bem como possa se disseminar por via hematogênica (WILLIAMS e TOMAS, 1990).

As subunidades repetitivas que formam as cápsulas, variam em qualidade e quantidade, fato que confere diferenças aos tipos sorológicos e também determina a capacidade do microrganismo, ou não, de resistir à fagocitose por macrófagos. Os tipos sorológicos que não possuem repetições de manose ou ramnose, não são reconhecidos por receptores manose-específicos de macrófagos e, portanto, deixam de ser englobados por estas células (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

Deste modo, o predomínio de morfotipos mucóides de *K.pneumoniae* do presente estudo, sugere que os isolados utilizam a presença da cápsula como um fator de resistência ao sistema imune do hospedeiro, podendo ser portanto, um marcador de virulência.

Analisando amostras de *K.pneumoniae* causadoras de abscesso hepático primário Hsueh e colaboradores (2002), encontraram colônias mucóides e não mucóides, pertencentes a um mesmo clone. Os autores postulam que a base genética para a síntese do material mucóide deve ser determinada cromossomalmente ou, deve ser dependente da aquisição de plasmídio específico ou ainda, de algum fago relacionado., mas ressaltam que a síntese de material mucóide deve ser regulada pelas características do ambiente no qual a bactéria esteja se desenvolvendo. Deste modo, poderia supor-se que os procedimentos decorrentes da hospitalização poderiam selecionar cepas mucóides e/ou influenciar a expressão de cápsula em *K.pneumoniae*.

Observou-se neste estudo, que os isolados hospitalares foram predominantemente capsulados, porém, somente quatro amostras (16%) mostraram o gene *kpsII*, que codifica para o sorotipo capsular tipo 2 de *K.pneumoniae*. Seria necessário realizar a tipagem destas amostras para a complementação deste estudo, porém, infelizmente, não dispomos de centros de referência para a tipagem de *Klebsiella* em nosso meio.

Os resultados deste estudo confirmam a ocorrência dos genes de virulência relatados para *K.pneumoniae* de origem clínica e reforçam que os isolados hospitalares investigados podem ser capazes de determinar processos infecciosos.

Os dados obtidos mostram que *K.pneumoniae* de origem hospitalar produz mecanismos para a multiresistência aos antimicrobianos de utilização rotineira na prática clínica; que possuem capacidade de adesão, fixação, colonização e agressão aos diferentes tipos de tecidos; que apresentam aparatos para sobreviver em ambientes e situações inóspitas; além de estarem aptos a desenvolver mecanismos de escape ao sistema imunológico do hospedeiro.

Desta forma, *K.pneumoniae* é patógeno oportunista que pode ser a causa de patologias graves. Tipicamente, as infecções ocasionadas por *Klebsiella* são nosocomiais e por cepas multiresistentes, produtoras de ESBL. O paciente hospitalizado, imunocomprometido por doenças de base é o principal alvo desta bactéria. Neste contexto, *K.pneumoniae* é agente emergente nas infecções hospitalares, uma vez que se tem observado um aumento gradativo deste patógeno dentre os bacilos Gram-negativos e ainda apresenta a característica agravante da limitação terapêutica, impondo medidas de controle rigorosas para conter as infecções hospitalares ocasionadas por este microrganismo.

O estudo de outros fatores de resistência e virulência em *K.pneumoniae*, assim como as relações desta bactéria com o hospedeiro e o meio ambiente, poderão contribuir para a compreensão da dinâmica das infecções hospitalares como um todo e auxiliar, sobremaneira, na padronização de ações que visem minimizar tais infecções.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo mostraram que:

- 1- Isolados hospitalares de *K.pneumoniae* apresentaram altas taxas de resistência às cefalosporinas de terceira geração;
- 2- Os isolados hospitalares de *K.pneumoniae* apresentaram prevalência de ESBL, enquanto que os isolados comunitários não produziram essas enzimas;
- 3- A maioria dos isolados ESBL-positivos apresentou pelo menos dois genes codificadores para beta-lactamases;
- 4- *K.pneumoniae* apresentou plasmídios de elevada massa molecular distribuídos nos três grupos, embora os isolados hospitalares apresentassem maior número de plasmídios por amostra;
- 5- *K.pneumoniae* possui genes para a montagem de fímbrias tipo 1 e tipo 3 porém, isolados comunitários mostraram ser estatisticamente diferentes quanto a capacidade de produzir a adesina da fímbria tipo 3;
- 6- *K.pneumoniae* isolados de infecção mostraram maior prevalência do gene que codifica o receptor para aerobactina;
- 7- Isolados de *K.pneumoniae* de infecção apresentaram maior número de sequências gênicas relacionadas aos fatores de virulência investigados.

Conclui-se que, os isolados de *K.pneumoniae* que apresentam resistência a cefalosporinas por produzirem ESBL, que possuem codificação gênica para o receptor de aerobactina e para a adesina da fímbria tipo 3, apresentam maior potencial de patogenicidade.

APÊNDICE

APÊNDICE

1.-MEIOS DE CULTURA

1.1-Agarose (0,8%, 1,0%, 1,5% e 2%)

Foi pesada a quantidade de agarose necessária para a concentração desejada, dissolvida a quente em 70ml de solução tampão TEB [1x] (Apêndice 2.3), diluída 20 vezes, resfriada a aproximadamente 50°C e vertida no suporte para gel em cuba de eletroforese vertical ou horizontal.

1.2-Agar Mac Conkey - MCA

O Agar foi dissolvido em água destilada e autoclavado conforme recomendações do fabricante (Difco Becton-Dickinson and Co, Maryland, EUA).

1.3- Agar Mueller-Hinton – MHA

O meio de cultura foi dissolvido em água destilada e autoclavado conforme especificações do fabricante (Difco- Becton-Dickinson and Co., Maryland, EUA). O controle de esterilidade feito por incubação a 37°C por 18 a 24 horas e estocado a 4°C por um período de até oito dias.

1.4-Agar Nutriente -AN

O Agar nutriente foi preparado com 10g de peptona, 5g de extrato de carne, 5g de NaCl, 15g de Agar e 1.000mL de água destilada. Ajustado o pH para 7.5 e autoclavado a 121°C durante 15 minutos. Mantido em temperatura ambiente.

1.5-Agar Sangue

A base utilizada para preparar o Agar sangue foi o Agar Mueller-Hinton – MHA (Apêndice 1.3), o qual foi reidratado conforme recomendações

do fabricante (Difco- Becton-Dickinson Co., Maryland, USA). Foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e resfriado a 50°C para adição de 5% de sangue desfibrinado, de carneiro. O controle de esterilidade foi feito por incubação a 37°C., durante 18 a 24 horas e estocado sob refrigeração.

1.6-Caldo Luria Bertani – LB

Este meio foi preparado com 10g de triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de NaCl, 0,2mL de NaOH (10mM) e 1.000mL de água destilada, autoclavado a 121°C durante 15 minutos. O controle de esterilidade foi feito por incubação a 37°C por 18 a 24 horas e estocado em temperatura ambiente.

1.7-Caldo Mueller-Hinton – MHB

O meio de cultura foi dissolvido em água destilada, autoclavado conforme especificações do fabricante (Merck, Rio de Janeiro-RJ, Brasil). O controle de esterilidade feito por incubação a 37°C por 18 a 24 horas e estocado a 4°C por um período de até 15 dias.

1.8-Caldo Triptona de Soja – TSB

O meio de cultura foi dissolvido em água destilada e autoclavado conforme especificações do fabricante (Merck, Rio de Janeiro-RJ, Brasil). O controle de esterilidade foi feito por incubação a 37°C por 18 a 24 horas e após, estocado a 4°C por um período de até 15 dias.

1.9- Meio Cary-Blair

Tioglicolato de sódio	1,5g
Fosfato sódico bibásico	1,1g
NaCl	5,0g
Agar	5,0g
H2O destilada q.s.p.	1000ml

Todos os componentes foram dissolvidos a quente e esterilizados em vapor fluente durante uma hora. O meio foi estocado sob refrigeração por até 15 dias.

1.10-Meio EPM

Base- Triptona	10,0g
Extrato de carne	2,0g
L-Triptofano	2,0g
NaCl	5,0g
Na ₂ HPO ₄	1,22g
Agar	11,0g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000ml

Solução A- Solução alcoólica de azul de bromotimol 1,5%, pH 7,0

Solução B-

Citrato de ferro amoniacal	2,0g
Tiosulfato de sódio	2,0g
Glicose	10,0g
Uréia	40,0g
H ₂ O destilada	84,0ml

Todos os componentes da **Base A** foram dissolvidos a quente e autoclavados a 121°C por 15 minutos. Resfriado em banho-maria (aproximadamente 50°C) e adicionado a **solução A** e 17,6g da **solução B** para cada 1000ml de base. O meio foi estocado por até 15 dias sob refrigeração.

1.11-MILi Agar

L-triptofano	2,0g
Extrato de levedura	3,0g
Peptona	10,0g
Triptona	10,0g
L-lisina	10,0g
Glicose	1,0g

Agar	1,8g
H ₂ O destilada	1000ml

Solução A - Solução alcoólica de púrpura de bromocresol ,0,02%

Todos os componentes foram dissolvidos a quente, medido o pH 7,2 e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Resfriado em banho-maria (aproximadamente 50°C) e adicionado a solução alcoólica de púrpura de bromocresol. O meio foi estocado por até 15 dias sob refrigeração.

2- REAGENTES E SOLUÇÕES

As soluções e tampões foram dissolvidos em água bidestilada, ultrapura, pelo sistema Milli Q (Millipore, São Paulo, SP.)

2.1-Solução Tampão Tris-HCl , pH 7,0

Trizma-base	20mM
EDTA	1mM
H ₂ O bidestilada q.s.p.	1000ml

Após dissolução a quente do Na₂EDTA foram adicionados Trizma base (pH8,0) e água bidestilada para completar o volume. A solução foi, então, autoclavada a 121°C por 15 minutos e mantida em temperatura ambiente.

2.2- Solução Tampão Tris-EDTA, pH 8,0 - TE

Trizma- base HCl	10mM
EDTA	1mM
H ₂ O bidestilada q.s.p.	1000ml

Após dissolução a quente do Na₂EDTA, foram adicionados Trizma base (pH8,0) e água bidestilada para completar o volume. A solução foi, então, autoclavada a 121°C por 15 minutos e mantida em temperatura ambiente.

2.3- Solução Tris-EDTA-Borato, pH 8.0 [10X] - TEB

Trizma base	0,89mM
Ácido bórico	0,89mM
EDTA(ethylenediaminetetracetic acid)	0,02M
Água bidestilada q.s.p.	1000 ml

Após dissolução a quente do Na₂EDTA, em aproximadamente 500ml de água bidestilada, foram adicionados os demais componentes. O pH foi ajustado para 8,0 e o volume completado para 1000ml. No momento do uso, esta solução foi diluída em água bidestilada.

2.4- Solução Tampão de Lise – pH 12,45

NaOH	2N
Tris base	50mM
SDS	3%

Cada solução foi feita em separado. Ressuspensão o Tris-base e o SDS em 7,5mL de água destilada e acrescentado 410µL da solução de NaOH 2N. Completado o volume para 10mL. Conferido o pH 12,45.

2.5- Solução Ficoll – Azul de Bromofenol

Ficoll	10%
Azul de Bromofenol	0,025%
Tris-EDTA –TE, pH 8,0	

O ficoll foi dissolvido a quente em solução tampão TE (item 2.2) e, após o resfriamento da solução, foram adicionados azul de bromofenol e solução tampão TE pH 8,0 para completar o volume.

2.6- Solução Ficoll – Xilenocianol [5X]

Xilenocianol 0,0125g; Ficoll 1,5g; H₂O destilada, q.s.p. 10mL Foi usada uma solução 0,125µL de xilenocianol [5x] e adicionado ficoll a 15%.

2.7-Solução Fenol-Clorofórmio

Fenol redestilado	50ml
Hidroxiquinolina (0,1%)	0,05g
Tris –base HCl	1M
Clorofórmio	50ml
Alcool-isoamílico	0,5ml

O fenol foi dissolvido em banho-maria. Adicionada a hidroxiquinoleína e o tampão Tris. Agitado por 5 min. Após, deixado a 4°C para o aparecimento de duas camadas. Desprezada a camada superior e adicionado o tampão TNE. Desprezada a camada superior. Adicionado 50mL de clorofórmio e o álcool isoamílico. Misturado por cinco min. Após o aparecimento da dupla camada a 4°C permaneceu estocado sob refrigeração até o momento do uso e protegido da luz.

2.8- Tampão de Reação para PCR [10X]

Tris-HCl, pH .9.0	75mM
KCl	50mM
MgCl ₂	2mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	20mM

A solução foi preparada em água bidestilada (Milli-Q) e autoclavada a 121°C durante 15 minutos. No momento do uso, foi diluída 10 vezes na mistura final da reação.

2.9- Tampão da Taq DNA polimerase

Tris-HCl, pH .8.0	10mM
KCl	50mM
EDTA	1mM
Triton X-100	0,1%
Glicerol	50% (v/v)

A solução foi preparada em água bidestilada e esterilizada, sendo estocada a -20°C.

2.10-Solução de oligonucleotídeos (dNTP) fosfatados (10mM)

As soluções de desoxinucleotídeos (dNTP), desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxicitosina e desoxitimidina) trifosfatadas (Gibco BRL® *Life Technologies*, Grand Island, NY, USA), obtidos separadamente na concentração de 10mM, foram preparadas em solução tampão própria e armazenadas a -20°C .

No momento do uso, cada uma das soluções foi diluída em água bidestilada e esterilizada, para uma concentração final de 0,2mM, na mistura da reação.

2.11-Solução de Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos, obtidos sob a forma liofilizada, foram diluídos em água bidestilada (Milli-Q) e autoclavada a 121°C por 15 minutos, na concentração de 100pM/ μl e mantidos a -20°C .

Na reação, foi utilizada a concentração de 0,5pM/ μL .

2.12-Solução de brometo de etídio (5mg/ml)

O brometo de etídio foi dissolvido em solução tampão Tris a 0,05M (pH 8,5) e armazenado em frasco escuro à temperatura de 4°C .

No momento do uso, 50 μL de solução de brometo de etídio foi diluído em 100mL de água destilada e protegido da luz.

2.13- Solução para diluir cem pares de base (100pb)

Foram utilizados 2,5 μL da solução de 100pb, adicionados 10 μL da solução de ficol com xilenocinol [5x] e 50 μL de água ultra pura e autoclavada, para completar o volume necessário.

2.14- Solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4 – PBS

NaCl	136,9mM
KCl	2,7mM
Na ₂ HPO ₄	8,1mM
KH ₂ PO ₄	1,5mM
H ₂ O	1000mL

Os sais foram dissolvidos em água deionizada e a solução foi autoclavada a 121°C, por 15 minutos, sendo armazenada a 4°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, S. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter and Serratia*. In.: Murray, R.P. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 7ed. Washington, American Society for Microbiology, 1999. p. 475-482.
- ABRAHAM, S.H., FRIETAG, C.S., CLEMENTS, J.R. A invertibili element of DNA controls phase variation of type I fimbriae of *Escherichia coli*. **Proc. Natt. Acad. Sci USA**, v. 82, p. 5724-5726, 1985.
- ALBERTÍ, S., QUÍNONES, F.R., SCHIRMER, T., RUMMEL, G., TOMÁS, J.M., ROSEBUSCH, J.P., BENEDÍ, V.. A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three-dimensional model, and complement binding. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 903-910, 1995.
- ALLEN, B.L., GERLACH, G.F., CLEGG, S.. Nucleotide sequence and functions of *mrk* determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 173, n. 2, p. 916-920, 1991.
- AMAKO, K., MENO, Y., TAKADE, A. Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 4960-4962, 1988.
- AMERINO, S., CAMPRUBI, S., ALBERTÍ, S. BENEDÍ, V.J., TOMÁS, J.M.. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2529-2535, 1992.
- ANDERSON, MJ, JANOFF, E.N. *Klebsiella* endocarditis: report of two cases and review. **Clin. Infect. Dis.**, v.26, p. 468-474, 1997.
- ATHAMNA, A., OFEK, I., KEISARI, Y., MARKOWITZ, S., D.G.G.S. SHARON, N. Lectinophagocytosis of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* mediated by surface lectins of guinea pig alveolar macrophages and human monocytic-derived macrophages. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 1673-1682, 1991.
- BABINI, G.S., LIVERMORE, D.M. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 45, n.2, p.183-189, 2000.
- BARBOSA, R.C., SILVA, C.M.C., HIZUKA, S.M., CAVASSIN, E.D., PERUGINI, M.R.E. Beta-lactamase de espectro estendido: prevalência e comparação de métodos de *screening*. **Semina: C. Biol./Saúde.**, v.20/21, n. 2, p. 17-24, 1999/2000.

- BAUER, A.W., KIRBY, W.M.M. SHERRIS, J.C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, p.493-496, 1966.
- BINDEREIF, A., NEILANDS, J.B.. Cloning of the aerobactin-mediated iron assimilation system of plasmid Col V. **J. Bacteriol.**, v. 153, n. 2, p. 1111-1113, 1983.
- BLAZQUEZ, J. Selection of naturally occurring extended-spectrum TEM beta-lactamase variants by fluctuating beta-lactam pressure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 8. p. 2182-2184, 2000.
- BEM-HAMOUDA, T., FOULON, T., BEM-CHEIKB-MASMOUDI, A., FENDRI, C., BEDHADJ, O., BEM-MAHREZ, K. Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. **J. Méd. Microbiol.**, v.52, n. Pt 5, p.427-433, 2003.
- BISSON, G., FISHMAN, N.O., PATEL, J.B., EDELSTEIN, P.H., LAUTENBACH, E. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: risk factors for colonization and impact of antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence. **Infect. Contr. Hosp. Epidemiol.**, v. 23. n. 5, p. 254-260, 2002.
- BONNET, R. DUTOUR, C., SAMPAIO, J. L., CHANAL, C., SIROT, D., LABIA, R., De CHAMPS, C., SIROT, J. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240 to Gly. **Antimicrob. Agents chemother.**, v. 45, n. 8, p. 2269-2275, 2001.
- BONTEN, M.J.M., WEINSTEINS, R.A. The role of colonization in the pathogenesis of nosocomial infections., **Infect. Contr. Hosp. Epidemiol.**, v. 17, n. 3, p. 193-200, 1996.
- BOYCE, J.M. Treatment and control of colonization in the prevention of nosocomial infections. **Infect. Contr. Hosp. Epidemiol.**, v.17, n.4, p. 256-261, 1996
- BRADFORD, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001.
- BRADFORD, P. A. URBAN, C., MARIANO, N., PROJAN, S.J., RAHAL, J.J., BUSH, K.. Emergence of third generation cephalosporin (3^a cef) resistance among *Escherichia coli* isolates implicated in bovine calf scours. In: ANNUAL INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, San Diego, 38th, 1998.

BRITO, B.G.A., LEITE, D.S., LINHARES, R.E.C., VIDOTTO, M.C. Virulence-associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. **Vet. Microbiol.**, v. 65, p. 123-132, 1999.

BUSH, K. New beta-lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 1085-1090, 2001.

BUSH, K, JACOBY, G.A., MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.

CARTER, M.W., OAKTON, K.J., WARNER, M., LIVERMORE, D.M. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella* with the Oxoid combination disk method. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 11, p. 4228-4232, 2000.

CASADEVALL, A., PIROFSKI, L.A. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **J. Infect. Dis.**, v. 184, n. 3, p.337-344, 2001.

CASELLAS, J. M. ESBL na Argentina. O problema de ESBL CTX-M-2 em Buenos Aires. In: SIMPÓSIO - Beta-LACTAMASES COM ESPECTRO AMPLIADO: INCIDÊNCIA, IMPORTÂNCIA E SOLUÇÕES, 2000, Buenos Aires. **Infect. Dis. in Clin. Pract.**, suplemento especial, p. 7-9, 2000.

CAVASSIN, E.D., PERUGINI, M.R.E., SILVA, C.M.C., HIZUKA, S.M., MAMIZUKA, E.M., PELISSON, M., LEVY, C.E. Prevalência de produtoras de ESBL entre 3554 isolados clínicos de *Klebsiella* spp. e *E.coli* em um hospital escola de grande porte. In: VIII Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2002, Curitiba. Anais do VIII Congresso.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Laboratory capacity to detect antimicrobial resistance, 1998. **Morbidity and mortality Weekly Report**, Atlanta, 48, p. 1167-1171, 2000.

CLEGG, S., KORHONEN, K.T., HORNICK, B.D., TARKKANEN, A-M. Type 3 fimbriae of the Enterobacteriaceae. **Infect. Immun.** v.60, p.1597-1604, 1994.

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

CORTÉS, G., ÁLVAREZ, D., SAUS, C., ALBERTÍ, S. Role of lung epithelial cells in defense against *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. **Infect. Immun.**, v. 70, n.3, p. 1075-1080, 2002.

CROSA, J.H.. The relationship of plasmid-mediated iron transport and bacterial virulence. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 38, p.69-89, 1984.

CROWLEY, B.D. Extended-spectrum β -lactamases in blood culture isolates of *Klebsiella pneumoniae*: seek and you may find! **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 47, p. 728-729, 2001.

DALL'AGNOL, M., MARTINEZ, M.B. Iron uptake from different compounds by enteroinvasive *Escherichia coli*. **Rev. Microbiol.**, v. 30, n. 2, p. 149-152, 1999.

DAVIS, T.J., MATSEN, J.M.. Prevalence and characteristics of *Klebsiella* species: relation to association with a hospital environmental. **J. Infect. Dis.**, v. 130, p. 412-415, 1974.

DATTA, N. Epidemiology and classification of plasmids. P. 9-15. In: D. SCHLESINGER. **Microbiology**, 1974, Washington, ASM Press, 1975.

DATTA, N., HEDGES, R. W. Compatibility groups among *fim* R factors. **Nature.**, v. 234, p. 222-223, 1971.

di MARTINO, P., CAFFERINI, N., JOLY, B., DARFEUILLE-MICHAUD, A.. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. **Res. Microbiol.**, v. 154, n. 1, p. 9-16, 2003.

di MARTINO, P., LIVRELLI, V., SIROT, D., JOLY, B., MICHAUD, A.D.. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 6, p. 2266-2273, 1996.

di MARTINO, P., BERTIN, Y., GIRARDEAU, J.P., LIVRELLI, V., JOLY, B., MICHAUD, A.D.. Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 11, 1995.

DORMAN, C.J., HIGGINS, C. Fimbrial phase variation in *Escherichia coli* dependence on integration host factor and homologies with other site-specific recombinases. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 3840-3843, 1987.

DUTOUR, C., BONNET, R., MARCHANDIN, H., BOYER, M., CHANAL, C., SIROT, D., SIROT, J. CTX-M-1, CTX-M3, and CTX-M-14 beta-lactamases from Enterobacteriaceae isolated in France. **Antimicrob. Agents Chemother.**, n. 46, v. 2, p. 534-537, 2002.

EDWARDS, and EWING'S. **Identification of Enterobacteriaceae**, 4th ed., Elsevier, 1986, New York.

EISEN, D. RUSSELL, E.G., TYMMS, M., ROPER, E.J., GRAYSON, M.L., TURNIDGE, J.. Random amplified polymorphic DNA and plasmid analyses used in investigation of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. **Jour. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 3, p. 713-717, 1995.

- FADER, R.C., DAVIES, C.P. Effect of piliation on *Klebsiella pneumoniae* infection in rat bladders. **Infect. Immun.**, v. 30, p. 554-561, 1982
- FANG, C.T., CHIEN, Y.C., CHANG, S.C., SAU, W.Y., LUH, K.T. *Klebsiella pneumoniae* meningitis timing of antimicrobial therapy and prognosis. **QJM.**, v. 93, n. 1, p. 45-53, 2000.
- FARMER III, J.J. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. In.: Murray, R.P. et al.- **Manual of Clinical Microbiology**. 7ed. Washington. American Society for Microbiology, 1999. p. 442-458.
- FAVRE-BONTÉ, S., JOLY, B., FORESTIER, C. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 2, p. 554-561, 1999.
- GALES, A.C., BOLMSTRÖM, A., SAMPAIO, J., JONES, R.N., SADER, H.S. Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBL) isolated in Hospitals in Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 1, n. 4, p. 196-203, 1997.
- GAILLOT, O., MARUÉJOULS, C., ABACHIN, E., LECURU, F., ARLET, G., SIMONET, M., BERCHE, P. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 1357-1360, 1998.
- GERLACH, G.F., ALLEN, B.L., CLEGG, S. Type 3 fimbriae among enterobacteria and the ability of spermidine to inhibit MR/K hemagglutination. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 1, p. 219-224, 1989.
- GERLACH, G.F., ALLEN, B.L., CLEGG, S. Molecular characterization of the type 3 (MR/K) fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 170, n. 8, p. 3547-3553, 1988.
- GONTIJO-FILHO, P.P., STUMPF, M., CARDOSO, C.L. Survival of Gram-negative and Gram-positive bacteria artificially applied on the hands. **J. Clin. Microbiol.**, v. 21, n. 4, p. 652-653, 1985.
- GOUSSARD, S e COURVALIN, P. Updated sequence information for TEM beta-lactamase genes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, n. 2, p. 367-370, 1999.
- GREENE, J.N. The microbiology of colonization, including techniques for assessing and measuring colonization. **Infect. Contr. Hosp. Epidemiol.**, v. 17, n. 2, p. 114-118, 1996.
- GRIFFITHS, E.. The iron-uptake systems of pathogenic bacteria. In: Bullen JJ & Griffiths E. (editors). Iron and infection, Molecular, Physiological

Aspects. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, united Kingdom, 69-137. Apud VIDOTTO, M.C., TERRA, V.A., LIMA, G.S.C.C., ALFIERI, A.F., GOES, C.R., CAÇAO, J.M.C.. Iron-regulated outer-membrane proteins of strains of avian septicemic *Escherichia coli*. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, v. 27, p. 1291-1297, 1994.

GUERINOT, L.M. Microbial iron transport. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 743-772, 1994.

HANSEN, D.S., MESTRE, F., ALBERTÍ, S., HERNANDEZ-ALLÉS, S., ÁLVAREZ, D., DOMÉNECHI-SANCHES, A., GIL, J., MERINO, S., TOMÁS, J.M., BENEDÍ, V.J. *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: Revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 1, p. 56-62, 1999.

HANSON, N.D., THOMSON, K.S., MOLAND, E.S., SANDERS, C.C., BERTHOLD, G., PENN, R.G. Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBL and plasmid-mediated AmpC. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 44, p. 377-380, 1999

HART, C. *Klebsiella* and neonats, **J. Hosp. Infect.**, v.23, p.83-86, 1993.

HERITAGE, J., M'ZALI, F.H., GASCOYNE-BINZI, D., HAWKEY, P.M. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 44, p. 309-318, 1999.

HERRUZO-CABRERA, R., GARCIA-CABALLERO, J., MARTIN-MORENO, J.M., GRACIANI-PEREZ-REGDERA, M.A., PEREZ-RODRIGUEZ, J. Clinical assay of N-duopropenide alcohol solution on hand application in newborn and pediatric intensive care units: control of outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a newborn intensive care unit with this measure. **Amer. J. Infect. Contr.**, v. 29, n. 3, p. 162-167, 2001.

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

HOBSON, K., BONTEN, M.J.M., JARVIS, W.R. Nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients receiving antacids, ranitidine, or sucralfate as prophylaxis for stress ulcer: a randomized controlled trial. **Ann. Intern. Med.**, v. 120, p. 653-662, 1996.

HORNICK, D.B., THOMMANDRU, J., SMITS, W., CLEGG, S. . Adherence properties of an *mrkD*-negative mutant of *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 5, p. 3026-3032, 1995.

HORNICK, D.B., ALLEN, B.L., HORN, M.A., CLEGG, S. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella*

pneumoniae type 3 fimbrial gene products. **Infect. Immun.**, v. 61, p.1577-1588, 1992.

HORNICK, D.B., ALLEN, B.L., HORN, M.A., CLEGG, S.. Fimbrial types among respiratory isolates belonging to the family *Enterobacteriaceae*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n. 9, p. 1795-1800, 1991

HOWARD, C., van DAAL,A., KELLY,G., SCHOONEVELDT, J., NIMMO, G., GIFFARD, P.M. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV beta-lactamases in nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46, n.3, p. 659-664, 2002.

HSUEH, P-R., WU, J-J, TENG, L-J., CHEN,Y-C, YANG, P-C., HO, S-W., LUH, K-T. Primary liver abscess caused by one clone of *Klebsiella pneumoniae* with two colonial morphotypes and resistotypes. **Emerg. Infect. Dis.J.**, v. 8, n.1, p. , 2002.

ITOKAZU, G. S., QUINN,J.P., BELL-DIXON,C., et al Antimicrobial resistance rates among aerobic gram-negative bacilli recovered from patients in intensive care units: evaluation of a national postmarketing surveillance program. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 23, p. 779-784, 1996.

JACOBY, G.A., MEDEIROS, A.A. More extended-spectrum beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** V. 35, p. 1697-1704, 1991.

JARVIS, W.R.. The epidemiology of colonization. **Infect. Contr. Hosp. Epidemiol.**, v.17, n. 1, p. 47-51, 1996.

JARLIER,V.,NICOLAS,M.H., FOURNIER,G., PHILIPPON, A. Extended broad-spectrum Beta-lactamases conferring transferable resistance to newer Beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae* hospital prevalence and susceptibility patterns. **Rev. Infect. Dis.**, v. 10, p. 867-878, 1988.

JOHNSON, J.R., STELL, A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 261-272, 2000.

JOHNSON, J.R.. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, n. 1, p. 80-128, 1991.

JONES,C.H., PINKNER, J.S., ROTH,R., HEUSER, J., NICHOLAS,A.V., ABRAHAM, S.N.. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the *Enterobacteriaceae*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.92, p. 2081-2085, 1995.

JONES,R.N., KUGLER,K.C., PFALLER, M.A. Characteristics of pathogens causing urinary tract infections in hospitals in North America: results from the

SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.35, n.1, p. 55-63, 1999.

KIL, K.S., DAROUICHE, R.O., HULL, R.A., MANSOURI, M.D., MUSER, D.M. Identification of a *Klebsiella pneumoniae* strain associated with nosocomial urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 9, p. 2370-2374, 1997.

KADO, C.L., LIU, S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. **J. Bacteriol.**, v. 145, p. 1365-1373, 1981.

KNOTHE, H., SHAH, P., KREMERY, V. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infect.**, v. 11, p. 315-317, 1983.

KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHERECKENBERGER, P.C., WINN JR, W.C. **Diagnostico microbiológico – texto e atlas colorido**, 5a.ed., Mosby, São Paulo, 2001

KORHONEN, T.K., TARKKA, E., RAUTA, H., HAAHTELA, K. Type 3 fimbriae of *Klebsiella* sp: molecular characterization and role in bacterial adhesion to plants roots. **J. Bacteriol.**, n.155, v.2, p. 860-865, 1983.

LANGSTRAAT, J., BOHSE, M., CLEGG, S. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 9, p. 5805-5812, 2001.

LAI, Y-C., YANG, S-L., PENG, H-L., CHANG, H-Y. Identification of genes present specifically in a virulent strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v.68, n.12, p. 7149-7151, 2000.

LIVRELLI, V., DE CHAMPS, C., DI MARTINO, P., DARFEUILLE-MICHAUD, A., FORESTIER, C., JOLY, B. Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 8, p. 1963-1969, 1996.

LITWIN, M.C.; CALDERWOOD, B.S. Role of iron in regulation of virulence genes. **Clin. Microbiol.**, v.6, p.137-149, 1993.

LIVERMORE, D.M. Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, s. D, p. 25-41, 1998.

LIVERMORE, D.M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 557-584, 1995.

LOCK, R, DAHIGNEN, C., LINDÉN, M., STENDAHL, O., SVENSBERGH, A., ÖHMAN, L. Neutrophil killing of two type I fimbria-bearing *Escherichia coli*

strains dependence on respiratory burst activation, **Infect. Immun.**, v. 58, p. 37-42, 1990.

MAAYAN, M.C., OFEK, I., MEDALIA, O., ARONSON, M. Population shift in mannose-specific fimbriated phase of *Klebsiella pneumoniae* during experimental urinary tract infection in mice. **Infect. Immun.**, v.49, p. 785-789, 1985.

MARTINS-LOUREIRO, M., MORAES, B.A., MENDONÇA, V.L.F., ROCHA-QUADRA, M.R., SANTOS-PINHEIRO, G., DUTRA-ASENSI, M. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from neonatal intensive care unit patients involved in hospital infection cases in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v.43, n.2, p. 88-85, 2001.

MATHAI, D., JONES, R.N. PFALLER, E. Epidemiology and frequency of resistance among pathogens causing urinary tract infections in 1510 hospitalized patients: a report from the SENTRY antimicrobial. Surveillance Program (North America). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 40, p. 129-136, 2001.

MEDEIROS, A. A. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 24(suppl 1), p. s19-s45, 1997.

MEDEIROS, A.A. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24 (suppl 1), p. S19-s45, 1995.

MENDES, C., HSIUNG, A., KIFFER, C., OPLUSTIL, C., SINTO, S., MIMICA, I., ZOCCOLI, C., MYSTIC STUDY GROUP. Evaluation of the *in vitro* activity of 9 antimicrobial against bacterial strains isolated from patients in intensive care units in Brazil: MYSTIC antimicrobial surveillance program. **Braz. Jour. Infect. Dis.**, v. 4, n. 5, 2000.

MERINO, S., CAMPRUBÍ, S., ALBERTÍ, S., BENEDÍ, V.J., TOMÁS, J.M. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2529-2535, 1992.

MIETZNER, T.A, MORSE, S.A. The role of iron-binding proteins in the survival of pathogenic bacteria. **Annu.Rev.Nutr.**, v. 14, p. 471-493, 1994.

MONTGOMERIE, J.Z., BINDEREF, A., NEILANDS, J.B., KALMANSON, G.M., GUZE, L.B. Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. **Infect. Immun.**, v.46, n. 3, p. 835-838, 1984.

- MONTGOMERIE, J.Z. Epidemiology of *Klebsiella* and hospital-associated infections. **Rev. Infect. Dis.**, v.1, p.736-753, 1979.
- M'ZALI, F.H., CHANAWONG, A., KERR, K.G., BIRKENHEAD, D., HAWKEY, P.M. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the MAST DD test, the double disk and the E-test ESBL. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.45, p. 881-885, 2000.
- NASSIF, X., SANSONETTI, P.J.. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. **Infect. Immun.**, v. 54, p. 603-608, 1986.
- NATHISUWAN, S. Extended-spectrum beta-lactamases: epidemiology, detection, and treatment. **Pharmacother.**, v. 21, n. 8, p. 920-928, 2001.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 12th informational supplement M100-S12. Wayne, Pennsylvania: **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, v. 22, n. 1, 2002.
- NEILANDS, J.B.. Microbiol envelope proteins related to iron. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 36, p. 285-309, 1982.
- OFEK, J. SHARON, N. Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 539-547, 1988.
- OLD, D.C., TAVENDALE, A., SENIOR, B.W. A comparative study of the type 3 fimbriae of *Klebsiella* species. **J. Med. Microbiol.**, v. 20, p. 203-214, 1985.
- OLLING, S..1977. Sensitivity of gram-negative bacilli to the serum bactericidal activity: a marker of the host parasitic relationship in acute and persisting infections. **Scand. J. Infect. Dis.**, 10 (Suppl):1-40. Apud PODSCHUN, R., ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.
- ORSKOV, I., FIFE-ASBURY. New *Klebsiella* capsular antigen, K82, and the deletion of five of those previously assigned. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 27: 386-387, 1979.
- OTMAN, J., PERUGINI, M.R.E., CAVASSIN, E. D. VIDOTTO, M. C. Study of an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* species in a neonatal intensive care unit in Brazil by means of Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence-based PCR (ERIC-PCR). **Infect. Contr. Hosp. Epidem.**, v.23, p. 8-9, 2002.

PADILHA, G., COSTA, S.O.P. Genética bacteriana. In.: TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F.G., FISCHMAN, O.,CANDEIAS, J.A.N.. **Microbiologia**, cap. 5, 3ª.ed., São Paulo, Atheneu, 1999, p.55-74.

PAN, Y.T., XU,B., RICE,K. Specificity of the high-mannose recognition site between *Enterobacter cloacae* pili adhesin and HT-29 cell membranes. **Infect. Immun.**, v.65, n.10, p. 4199-4206, 1997.

PARRY,S.H, ROOKE,D.M.. Adhesins and colonization factors of *Escherichia coli*. In.: Sussman (ed), **The virulence of *Escherichia coli***. Academic Press. Inc., London, p. 79-155, 1985.

PEÑA, C., PUJOL, M., ARDANUY, C.,RICART, A., PALLARES, R., LIÑARES, J., ARIZA, J., GUDIOL, F. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 53-58, 1998.

PESSOA-SILVA, CL., MOREIRA, B.M., ALMEIDA, V.C. PLANNERY, B., LINS,M.C.A., SAMPAIO, J.L.M., TEIXEIRA, L.M., MIRANDA, L. E.V., RILEY, L.W., GERBERDING, J.L. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: risk factors for infection and colonization. **J. Hosp. Infet.**, v.53, n.3, p.198-206, 2003.

PIROTH, I., AUBÉ, H., DOISE, J.M., VINCENT-MARTIN, M.S. Spread of extended-spectrum beta-lactamase- producing *Klebsiella pneumoniae*: are beta-lactamase inhibitors of therapeutic value? **Clin. Infect. Dis.**, v. 27, p. 76-80, 1998.

PITOUT, J. D. D.; SANDERS, C. D.; SANDERS, W. E. Antimicrobial resistance with focus on beta-lactam resistance in Gram-negative bacilli. **Amer. Jour. Med.**, New York, v. 103, p. 51-59, 1997.

PODSCHUN, R, PIETSCH, S., HÖLLER, C., ULLMANN, U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. **App. Envirom. Microbiol.**, v. 67, n. 7, p. 3325- 3327, 2001.

PODSCHUN, R., FISHER, A., ULLMANN, U. Characterization of *Klebsiella terrigena* strains from humans: haemagglutinins, serum resistance, siderophore synthesis and serotypes. **Epidemiol. Infect.**, v.125, n.1, p.71-78, 2000.

PODSCHUN, R., ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

PODSCHUN, R. SIEVERS, D., FISCHER, A., ULLMANN, U. Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing human urinary tract infections. **J. Infect. Dis.**, v. 168, p. 1415-1421, 1993.

POLLACK, M., NIEMANN, R.E., REINHARDT, J.A., CHARACHE, P., JETT, M.P., HARDY, P.H. Factors influencing colonization and antibiotic resistance patterns of gram-negative bacteria in hospital patients. **Lancet**, v. ii, p.668-671, 1972.

POMBA-FÉRIA, C., CANIÇA, M. A novel sequence framework (blaTEM-1G) encoding the parenteral TEM-1 beta-lactamase., **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 220, n. 2, p. 177-180, 2003

PRESTON, K.E., VENEZIA, R. A. Chromosomal sequences from *Klebsiella pneumoniae* flank the SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase gene in pACM1. **Plasmid.**, v.48, n.1, p. 73-76, 2002.

QUINN, J. P. Emerging resistance in the intensive care unit: extended-spectrum beta-lactamase enteric-producing pathogens as a prototype. **Medscape Critical Care Treatment Updates**, June 2001. Disponível em: <<http://www.medscape.com/Medscape/CriticalCare/TreatmentUpdate/2000/tu01/public/toc-tu01.html>> Acesso em: 15 de Julho de 2003.

RASHEED, J.K., ANDERSON, G.J., QUEENAN A.M., BIDDLE, J.W., OLIVER, A., JACOBY, G.A., BUSH, K., TENOVER, F.C. TEM-71, a novel plasmid-encoded, extended-spectrum beta-lactamase produced by a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemoth.**, v. 46, n. 6, p. 2000-2003, 2002.

ROSE, H.D., SCHREIER, J. 1968. The effect of hospitalization and antibiotic therapy on gram-negative fecal flora. **Am. J. Med. Sci.** 255: 228-236 apud PODSCHUN, R., ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

ROSEBURY, T., 1962. Microorganisms indigenous to man. McGraw Hill Book Co., New York, N.Y. Apud PODSCHUN, R., ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

ROSENTHAL, S., TAGER, I.R. 1975. Prevalence of gram-negative rods in the normal pharyngeal flora. **Ann. Intern. Med.** 83:355-357 apud PODSCHUN, R., ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

SADER, H.S. GALES, A.C., PFALLER, M.A., MENDES, R.E., ZOCCOLI, C., BARTH, A., JONES, R.N. Pathogens frequency and resistance patterns in Brazilian Hospitals: summary of results from three years of the Sentry Antimicrobial Surveillance Program. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.5, p. 200-214, 2001.

SADER, H.S. Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies. **Brazil. J. Infect. Dis.**, v. 4, p. 91-99, 2000.

SADER, H.S., JONES, R.N., WINOKUR, P.L., PFALLER, M.A., DOERN, G.V., BARRET, T. and the SENTRY Study Group, Latin America. Antimicrobial susceptibility of patterns for pathogens isolated from patients in Latin America hospitals. Results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997). **Clin. Microbiol. Infect.**, v.32, p. 149-152, 1999.

SADER, H.S., JONES, R.N. Cefalosporinas: quatro gerações de evolução estrutural. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 41, p. 144-150, 1995.

SAHLY, H., PODSCHUN, R., OELSCHLAEGER, T.A., GREIWE, M., PAROLIS, H., HASTY, D., KEKOW, J., ULLMANN, U., OFEK, I., SELA, S. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 12, p. 6744-6749, 2000.

SALYERS, A.A., WHITT, D.D. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. Washington, DC., ASM Press, 1994, p. 39-40.

SANDERS, W. E., SANDERS, C.C. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of century. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.10, n. 2, p. 220-241, 1997.

SCHEMBRI, M.A., KLEMM, P. Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel FimH variants and ramifications for virulence. **Infect. Immun.**, v.69, n. 3, p. 1322-1328, 2001.

SEBGHATI, T.A.S., KORHONEN, T.K., HORNICK, D.B., CLEGG, S. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 2887-2894, 1998

SIFUENTES-OSORNIO, J. ESBL na América Latina: seu impacto clínico. In: SIMPÓSIO - Beta-LACTAMASES COM ESPECTRO AMPLIADO: INCIDÊNCIA, IMPORTÂNCIA E SOLUÇÕES, 2000, Buenos Aires. **Infect. Dis. Clin. Pract.**, Philadelphia, Tradução de Vilma R. S. Varga, suplemento especial, p. 10-12, 2000.

SILVA, C.H.P.M. Beta-lactamase de espectro estendido: definições, importância clínica e detecção laboratorial. **Rev. Bras. Anal. Clín.**, v. 32, n. 3, p. 215-219, 2000.

SIU, L.K., LU, P.I., HSUEH, P.R., LIN, F.M., CHANG, S.C., LUH, K.T., HO, M., LEE, C.Y. Bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric oncology ward: clinical features and identification of different plasmids carrying both SHV-5 and TEM-1 genes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 12, p. 4020-4027, 1999.

TARKKANEN, A.-M., WIKSTRÖM, B.W., ERKKILÄ, L., KORHONEN, T.. Immunohistological localization of the MrkD adhesin in the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 66, n.5, p.2356-2361, 1998.

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

TARKKANEN, A.M., ALLEN, B.L., WILLIAMS, P.H., KAUPPI, M., HAAHTELA, K., SILTONEN, A. ORSKOV, I., ORSKOV, F., CLEGG, S., KORHONEN, T.K. Fimbriation, capsulation, and iron scavenging systems of *Klebsiella* strains isolated with human urinary tract infection. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 1187-1192, 1992.

THOM, R.T. 1970. *Klebsiella* in faeces. *Lancet*. lic:1033 apud PODSCHUN, R., ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L. R. EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano-desaminase. **Rev Microbiol**, v. 13, p. 309-315, 1982a.

TRAUB, B., WALTER, H., SCHWARZE, I., BAUER, D. Nosocomial outbreak of cross-infection due to multiple-antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae*: characterization of the strain and antibiotic susceptibility studies. **Chemother.**, v.46, p.1-14, 2000.

TSAY, R.W., SIU, L.K., FUNG, C.P., CHANG, F.Y. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection – risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. **Arch. Intern. Med.**, v.162, n. 9, p. 1021-1027, 2002.

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

VERNET, V., MADOULET, C., BAJOLET, O., PHILIPPON, A.. Incidence of two virulence factors (aerobactin and mucoid phenotype) among 190 clinical

- isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 96, p. 1-6, 1992.
- VERNET, V., PHILIPPON, A., MADOULET, C., VISTELLE, R., JAUSSAUD, R., CHIPPAUX, C.. Virulence factors (aerobactin and mucoid phenotype) in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* blood culture isolates. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 130, p. 51-57, 1995.
- VIDOTTO, M.C., TERRA, V.A., LIMA, G.S.C.C., ALFIERI, A.F., GOES, C.R., CAÇAO, J.M.C.. Iron-regulated outer-membrane proteins of strains of avian septicemic *Escherichia coli*. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, v. 27, p. 1291-1297, 1994.
- VIDOTTO, M.C., FURLANETO, M.C., PERUGINI, M.R.E. Virulence factors of *Escherichia coli* in urinary isolates. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, p. 365-373, 1991.
- WAINBERG, E.D. Iron and infection. **Microbiol. Rev.**, v. 42, p. 45-66, 1979.
- WILLIAMS, J.D. Beta-lactamase inhibition and in vitro activity of sulbactam and sulbactam/cefoperazone. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 494-497, 1997.
- WILLIAMS, P., TOMAS, J.M. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. **Rev. Med. Microbiol.**, v. 1, p. 196-204, 1990.
- WILLIAMS, P., CHART, H., GRIFFITHS, E., STEVENSON, P.. Expression of high affinity iron uptake systems by clinical isolates of *Klebsiella*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 44, p. 407-412, 1987.
- WOOLDRIDGE, K.G., WILLIAMS, P.H.. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 325-248, 1993.
- YOSHIDA, K., MATSUMOTO, T., TAKEDA, K., UCHIDA, K., TSUJIMOTO, S., YAMAGUCHI, K. Role of bacterial capsule in local and systemic inflammatory responses of mice during pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. **J. Med. Microbiol.**, v. 49, n. 11, p. 1003-1010, 2000.

ANEXOS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 11

São Paulo, 10 de março de 2003.

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 24 de fevereiro do corrente ano, **aprovou** o projeto "Fatores de virulência em amostras de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de surto em Unidade Neonatal de Tratamento Intensivo (UTI-NEO) de um Hospital Universitário", apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas ser informada a fonte financiadora do projeto em questão.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Tit. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

Ilmo(a) Sr(a).
Regina Mariuza Borsato Quesada
Orientador: Prof. Marina Baquerizo Martinez
FBC

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pretendo desenvolver uma pesquisa que tem por finalidade estudar como alguns micróbios fazem para causar doenças nas crianças recém-nascidas, para depois sugerir maneiras para evitar ainda mais estas infecções dentro dos berçários.

Para isso, necessito de amostras de fezes de bebês que não tenham diarreia ou outras doenças e que não estejam hospitalizados, para comparar com materiais de crianças recém-nascidas que estejam doentes e internadas.

Solicito sua autorização para colher uma amostra de fezes do seu bebê para este estudo. Informo que será uma única vez e que esta coleta não trará danos de nenhuma ordem para sua criança.

Esclareço que em qualquer momento a autorização poderá ser retirada e o material poderá ser excluído da pesquisa, pois em nenhum momento será usado o nome do bebê, somente o material cedido.

Nada será cobrado e os resultados permanecerão em total sigilo.

Esclareço ainda que, esta coleta de fezes não gera direito a atendimento no HURNP e qualquer dúvida posterior poderá ser esclarecida por mim, através do fone 3371-2346.

CONSENTIMENTO PÓS ESCLARECIDO

Eu, _____

declaro que fui esclarecida (o) sobre a pesquisa a ser desenvolvida e depois de ter entendido o que me foi explicado, autorizo a coleta de uma amostra de fezes do meu filho(a) para este estudo.

Londrina, ____/____/____

pesquisador
Dra. Regina M.B.Quesada

mãe ou responsável

ANEXO II

PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE FEZES / SWAB RETAL DE RN SAUDÁVEIS PARA A PESQUISA DE *Klebsiella pneumoniae*

FICHA

Nº. _____

NOME: _____

Data de nascimento: ____/____/____ peso: _____

Tempo de hospitalização: _____ dias

Tipo de parto: normal () cesárea ()

Aleitamento: peito () mamadeira ()

Diarréia nos últimos 8 dias: sim () não ()

Uso antibióticos nos últimos 8 dias: sim () não ()

Gripe/ resfriado nos últimos 8 dias: sim () não ()

Intervenção cirúrgica: sim () sítio anatômico _____ não ()

Infecção Urinária nos últimos 15 dias: sim () não ()

Nome mãe ou responsável: _____

Endereço:

Posto de Saúde: _____

Cultura:

Cultura negativa p/ *K.pneumoniae* ()

Responsável pelo Cultivo
Regina M.B.Quesada

ANEXO III

TABELA 1- Padrão interpretativo dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento e CIM equivalentes, em pontos de corte, para *Enterobacteriaceae*, referente a cada antimicrobiano e sua respectiva concentração, segundo NCCLS.

Antimicrobianos	Concentração (μg)	Diâmetro do halo (mm)			CIM Pontos de corte ($\mu\text{g/mL}$)	
		R	I	S	R	S
Amicacina	30	≤ 14	15-16	≥ 17	≥ 32	≤ 16
Ampicilina	10	≤ 13	14-16	≥ 17	≥ 32	≤ 8
Ampicilina/Sulbactam	10/10	≤ 11	12-14	≥ 15	$\geq 32/16$	$\leq 8/4$
Amoxicilina/ Ac. Clavul.	20/10	≤ 13	14-17	≥ 18	$\geq 32/16$	$\leq 8/4$
Aztreonam	30	≤ 15	16-21	≥ 22	≥ 32	≤ 8
Cefalotina	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Cefepima	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Cefotaxima	30	≤ 14	15-22	≥ 23	≥ 64	≤ 8
Cefoxitina	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Cefpodoxima	10	≤ 17	18-20	≥ 21	≥ 8	≤ 2
Ceftazidima	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Ceftriaxona	30	≤ 14	15-22	≥ 23	≥ 64	≤ 8
Cefuroxima	30	≤ 14	15-22	≥ 23	≥ 32	≤ 4
Ciprofloxacina	5	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 4	≤ 1
Gentamicina	10	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
Imipenem	10	≤ 13	14-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
Levofloxacina	5	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 4	≤ 1
Meropenem	10	≤ 13	14-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
Nitrofurantoina	300	≤ 14	15-16	≥ 17	≥ 128	≤ 32
Norfloxacina	10	≤ 12	13-16	≥ 17	≥ 16	≤ 4
Piperacilina	100	≤ 17	18-20	≥ 21	≥ 128	≤ 16
Piperacilina/ Tazobactam	100/10	≤ 17	18-20	≥ 21	$\geq 128/4$	$\leq 16/4$
Ticarcilina/ ac. Clavulânico	75/10	≤ 14	15-19	≥ 20	$\geq 128/2$	$\leq 16/2$
Tobramicina	10	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
Trimetoprim/sulfametoxazol	1,25/ 23,75	≤ 10	11-15	≥ 16	$\geq 8/152$	$\leq 2/38$

Fonte: NCCLS, 2002.

ANEXO III

TABELA 2- Percentual de sensibilidade das amostras de *K.pneumoniae* dos grupos Hi, Hc e Co frente aos antimicrobianos de uso clínico.

Antimicrobianos	Hi (%) ^(*)	Hc (%) ^(*)	Co (%) ^(*)
Amicacina	76	88	96
Cefalotina	28	44	92
Cefazolina	36	48	96
Cefepima	52	72	100
Cefotaxima	36	48	100
Cefotetam	100	100	100
Cefpodoxima	36	48	100
Ceftazidima	36	52	100
Ceftriaxona	48	56	100
Cefuroxima	32	48	100
Ciprofloxacina	68	80	100
Gentamicina	56	60	96
Imipenem	100	100	100
Sulfamet+Trimetop	44	60	96

^(*) Percentuais de sensibilidade obtidos pelo método de microdiluição.

TABELA 3-Perfil de suscetibilidade apresentado pelas amostras do grupo Hi

Amostras	Antimicrobianos																			
	AMI	AMP	AVSUL	AMC	CFL	CPM	CFT	CTX	CPD	CAZ	CFR	CFU	CIP	GEN	IPM	PIP	PTZ	T/AC	TOB	SXT
Hi 1	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	>16	<16	>32	>4	>16	>32	>16	>2	>8	<1	>64	>64	>64	>8	>2/38
Hi 2	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	<4	<16	<16	<4	<16	>16	>16	>2	>8	<1	>64	64	>64	>8	>2/38
Hi 3	<16	>16	16/8	>16/8	>16	>4	<16	8	>16	8	>16	8	<0.5	<1	<1	>64	<16	<16	<4	<2/38
Hi 4	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	<4	<16	16	>16	<4	8	16	<0.5	<1	<1	>64	<16	<16	<4	<2/38
Hi 5	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0.5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Hi 6	<16	>16	>16/8	>16/8	16	<4	<16	<4	<1	<4	<4	<1	1	<1	<1	>64	>64	<16	<4	>2/38
Hi 7	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<8	<1	<4	<4	<1	<0.5	<8	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Hi 8	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	>4	<16	8	>16	8	>32	>16	<0.5	>8	<1	>64	<16	64	>8	<2/38
Hi 9	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	<4	<16	>16	>4	>16	>16	>16	<0.5	<1	<1	>64	<16	<16	<4	>2/38
Hi 10	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	>4	<16	>16	>16	>16	>32	>32	<0.5	<1	<1	>64	64	<16	>4	>2/38
Hi 11	>16	>16	>16/8	>16/8	>16	<4	<16	16	<1	16	<4	<4	>2	>8	<1	>64	>64	>64	>8	>2/38
Hi 13	>16	>16	>16/8	>16/8	>16	>16	<16	16	>4	16	>32	>32	>4	>8	<1	>64	>64	>64	>8	>2/38
Hi 17	32	>16	>16/8	>16/8	>16	<4	<16	<8	<1	<8	<8	16	4	>8	<1	>64	>64	>64	>8	>2/38
Hi 19	<16	>16	<8/4	<8/4	16	<4	<16	>16	<1	<8	<8	16	>2	<1	<1	<16	<16	<16	<4	>2/38
Hi 20	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	<4	<16	<4	>4	4	<8	>16	>2	<1	<1	>64	<16	<16	<4	>2/38
Hi 23	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	>4	<16	>32	>4	<8	>32	>16	<1	<1	<1	>64	<16	<16	>8	>2/38
Hi 24	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<8	<1	<8	<4	<1	<1	<1	<1	>64	>64	>64	>8	>2/38
Hi 29	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	>4	<16	>32	>16	16	>32	>16	1	<1	<1	>64	<16	<16	>8	>2/38
Hi 34	>32	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<8	<1	<8	>16	<1	1	<1	<1	>64	<16	<16	<4	>2/38
Hi 38	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	>16	<16	>32	>4	16	>32	>16	>2	>8	<1	>64	>64	>64	>8	>2/38
Hi 39	>32	>16	>16/8	>16/8	>16	<4	<16	>16	>32	>16	>16	>8	<0.5	>8	<1	>64	<16	64	>8	>2/38
Hi 40	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	<4	<16	8	>4	8	>32	>16	<0.5	>8	<1	>64	64	32	>8	>2/38
Hi 41	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	<4	<16	>16	>16	>16	>16	>16	<0.5	>8	<1	>64	>64	>64	>8	>2/38
Hi 43	>32	>16	>16/8	>16/8	>16	>16	<16	>16	>32	>16	>32	>16	>2	>8	<1	>64	>64	>64	>8	>2/38
Hi 44	<2	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<8	<1	<8	<4	<1	<1	<1	<1	<8	<16	<16	<4	>2/38

AMI- ampicilina(30µg); AMP- ampicilina(10µg); AVSUL- ampicilina/sulbactam(10/10µg); AMC-amoxicilina/ácido clavulânico(20/10µg); CFL- cefalotina (30µg); COM-cefepima(30µg); CFT- cefotetan(30µg); CTX- cefotaxima(30µg); CPD- cefpodoxima(10µg); CAZ- ceftazidima(30µg); CFR- ceftriaxona(30µg); CFU- cefuroxima(30µg); CIP-ciprofloxacina(5µg); GEN- gentamicina(10µg); IPM- imipenem(10µg); PIP- piperacilina/tazobactam(100/10µg); PTZ- piperacilina/tazobactam(100/10µg); T/AC- ticarcilina/ ácido clavulânico(75/10µg); TOB- tobramicina(10µg); SXT- sulfametoxazol/trimetoprim(1,25/23,75µg).

TABELA 4 -Perfil de suscetibilidade apresentado pelas amostras do grupo Hc.

Amostras	Antimicrobianos																			
	AMI	AMP	A/SUL	AMC	CEFL	CPM	CFT	CTX	CPD	CAZ	CFR	CFU	CIP	GEN	IPM	PIP	PTZ	T/AC	TOB	SXT
Hc 1	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	<4	<16	>32	>4	>16	>8	>4	<0,5	<1	<1	>64	<16	<16	>8	>2/38
Hc 2	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	>64	<16	<16	<4	<2/38
Hc 3	>32	>16	>16/8	>16/8	>16	>16	<16	>32	>4	>16	>32	>16	<0,5	8	<1	>64	>64	>64	>8	<2/38
Hc 4	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	<4	<16	>32	>4	16	>32	<4	<0,5	<1	<1	>64	<16	<16	>8	>2/38
Hc 5	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Hc 6	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Hc 7	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Hc 8	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Hc 9	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Hc 10	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	>16	<16	>32	>4	16	>32	>16	>2	>8	<1	>64	>64	>64	>8	>2/38
Hc 11	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	>16	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	>64	<16	<16	<4	>2/38
Hc 12	>32	>16	>16/8	>16/8	>16	>16	<16	>32	>4	>16	>32	>16	>2	>8	<1	>64	>64	>64	>8	>2/38
Hc 13	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	>16	<16	>32	>4	16	>32	>16	>2	>8	<1	>64	>64	>64	>8	>2/38
Hc 14	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Hc 15	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Hc 16	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	>16	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	>64	32	64	8	>2/38
Hc 17	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Hc 18	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Hc 19	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	>16	<16	>32	>4	16	>32	>16	>2	>8	<1	>64	>64	>64	>8	>2/38
Hc 20	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	64	<16	<16	<4	<2/38
Hc 21	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	>16	<16	>32	>4	16	>32	>16	>2	>8	<1	>64	>64	>64	>8	>2/38
Hc 22	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	>32	<16	>16	<8	<4	<0,5	>8	<1	<16	>64	<16	<4	<2/38
Hc 23	>32	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	>32	>4	>16	<8	>16	<0,5	<1	<1	>64	<16	<16	<4	>2/38
Hc 24	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	>16	<16	<4	>4	<2	<8	8	<0,5	>8	<1	>64	>64	>64	>8	<2/38
Hc 25	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Hc 25	<16	>16	>16/8	>16/8	>16	>16	<16	>32	>4	>4	>32	>16	<0,5	>8	<1	>64	>64	>64	>8	<2/38

AMI- ampicilina(30µg); AMP- ampicilina(10µg); A/SUL- ampicilina/sulbactam(10/10µg); AMC- amoxicilina/acido clavulânico(20/10µg); CFL- cefalofina (30µg); COM-cefepima(30µg); CFT- cefotetan(30µg); CTX- cefotaxima(30µg); CPD- cefpodoxima(10µg); CAZ- ceftazidima(30µg); CFR- ceftriaxona(30µg); CFU- cefuroxima(30µg); CIP- ciprofloxacina(5µg); GEN- gentamicina(10µg); IPM- imipenem(10µg); PIP- piperacilina(100µg); PTZ- piperacilina/tazobactam(100/10µg); T/AC- ticarcilina/ ácido clavulático(75/10µg); TOB- tobramicina(10µg); SXT- sulfametoxazol/trimetoprim(1,25/23,75µg).

TABELA 5- Perfil de suscetibilidade apresentado pelas amostras do grupo Co

Amostras	Antimicrobianos																			
	AMI	AMP	A/SUL	AMC	CFL	CPM	CFT	CTX	CPD	CAZ	CFR	CFU	CIP	GEN	IPM	PIP	PTZ	T/AC	TOB	SXT
Co 2	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 4	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 5	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 7	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 8	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 9	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 11	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 13	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 14	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 16	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 34	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 39	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 47	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 53	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 56	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 59	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 62	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 69	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 71	>16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 74	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	>2/38
Co 91	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 99	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 111	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 112	<16	>16	<8/4	<8/4	>8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38
Co 120	<16	>16	<8/4	<8/4	<8	<4	<16	<4	<1	<2	<8	<4	<0,5	<1	<1	<16	<16	<16	<4	<2/38

AMI- ampicilina(30µg); AMP- ampicilina(10µg); A/SUL- ampicilina/sulbactam(10/10µg); AMC- amoxicilina/acido clavulânico(20/10µg); CFL- cefalotina (30µg); COM-cefepima(30µg); CFT- cefotetan(30µg); CTX- cefotaxima(30µg); CPD- cefotaxima(10µg); CAZ- ceftazidima(30µg); CFR- ceftriaxona(30µg); CFU- cefuroxima(30µg); CIP-ciprofloxacina(5µg); GEN- gentamicina(10µg); IPM- imipenem(10µg); PIP- piperacilina(100µg); PTZ- piperacilina/tazobactam(100/10µg); T/AC- ticarcilina/ácido clavulático(75/10µg); TOB- tobramicina(10µg); SXT- sulfametoxazol/trimetoprim(1,25/23,75µg).

ANEXO IV

Tabela 1 – Conjunto de dados apresentados pelos isolados Hi de *K.pneumoniae*, correlacionando amostra, material biológico, mucosidade colonial, suscetibilidade a cefalotina, produção de ESBL e presença de genes codificadores de beta-lactamases

Amostras	Mat. Biol.	MUC	CFL	ESBL	blaTEM	blaSHV	blaCTX-M
Hi 1	Sangue.	+	R	+	+	-	+
Hi 2	Cateter.	+	R	-	+	-	+
Hi 3	Secreção	+	R	+	+	-	+
Hi 4	Secreção.	+	R	+	+	+	+
Hi 5	Secreção.	+	S	-	-	-	-
Hi 6	Secreção	-	S	-	-	-	-
Hi 7	Sangue	+	S	-	-	-	-
Hi 8	Secreção	+	R	+	+	-	+
Hi 9	Liq. Pleural	+	R	+	+	-	+
Hi 10	Sangue	+	R	+	+	-	+
Hi 11	Cateter	-	R	+	+	+	+
Hi 13	Urina	+	R	+	+	+	+
Hi 17	Urina	+	R	+	+	-	+
Hi 19	Urina	-	S	-	-	-	-
Hi 20	Urina	+	R	+	+	-	+
Hi 23	Urina I	+	S	+	-	-	-
Hi 24	Secreção	-	R	-	-	-	-
Hi 29	Urina	+	R	+	+	-	+
Hi 34	Tecido	+	S	-	-	-	-
Hi 38	Urina	+	R	+	+	-	+
Hi 39	Liq. Periton.	+	R	+	+	-	+
Hi 40	Sangue	-	R	+	+	-	+
Hi 41	Sangue	+	R	+	-	-	+
Hi 43	Tecido	+	R	+	-	-	-
Hi 44	Urina	+	S	-	-	-	-

Mat Biol.- material biológico; MUC- presença (+) ou ausência (-) do fenótipo mucóide; CFL- resistência (R) ou sensibilidade (S) à cefalotina ; ESBL – produção (+) ou ausência de produção (-) de beta-lactamase de espectro estendido; blaTEM, blaSHV e blaCTX-M – presença (+) ou ausência (-) de genes codificadores de beta-lactamases dos tipos TEM, SHV e CTX-M. Liq. Pleural- Líquido pleural; Liq. Periton. –Líquido peritoneal.

ANEXO IV

Tabela 2 – Conjunto de dados apresentados pelos isolados Hc de *K.pneumoniae*, correlacionando amostra, material biológico, mucosidade colonial, suscetibilidade a cefalotina, produção de ESBL e presença de genes codificadores de beta-lactamases

Amostras	Mat. Biol.	MUC	CFL	ESBL	blaTEM	blaSHV	blaCTX-M
Hc 1	Sec.Traq.	+	R	+	+	+	+
Hc 2	Sec.Traq.	+	S	-	-	-	-
Hc 3	Sec.Traq.	+	R	+	-	+	+
Hc 4	Sec.Traq.	+	R	+	-	+	+
Hc 5	Sec.Traq.	+	S	-	-	-	-
Hc 6	Sec.Traq.	+	S	-	-	-	-
Hc 7	Swab retal	-	S	-	-	-	-
Hc 8	Swab retal	+	S	-	-	-	-
Hc 9	Swab retal	+	R	+	+	+	+
Hc 10	Swab retal	-	S	-	-	-	-
Hc 11	Swab retal	+	R	+	+	+	+
Hc 12	Fezes	+	R	+	+	+	+
Hc 13	Swab retal	-	R	-	-	-	-
Hc 14	Fezes	-	S	-	-	-	-
Hc 15	Swab retal	+	R	+	+	+	+
Hc 16	Swab retal	-	S	-	-	-	-
Hc 17	Fezes	+	S	-	-	-	-
Hc 18	Swab retal	+	R	+	+	+	+
Hc 19	Fezes	+	S	-	-	-	-
Hc 20	Swab retal	+	R	+	+	+	+
Hc 21	Swab retal	+	R	+	+	+	+
Hc 22	Fezes	-	R	+	+	+	+
Hc 23	Fezes	+	R	+	-	-	-
Hc 24	Sec. Traq.	+	S	-	-	-	-
Hc 25	Sec. Traq.	-	R	+	+	-	+

Mat Biol.- material biológico; MUC- presença (+) ou ausência (-) do fenótipo mucóide; CFL- resistência (R) ou sensibilidade (S) à cefalotina ; ESBL – produção (+) ou ausência de produção (-) de beta-lactamase de espectro estendido; blaTEM, blaSHV e blaCTX-M – presença (+) ou ausência (-) de genes codificadores de beta-lactamases dos tipos TEM,SHV e CTX-M. Séc.Traq.- secreção traqueal;

ANEXO V

TABELA 1- Ocorrência de seqüências gênicas que codificam beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) dos tipos TEM, SHV e CTX-M, em amostras de *K. pneumoniae* dos grupos Hi e Hc.

Isolados Hi	Seqüências gênicas			Isolados Hc	Seqüências gênicas		
	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}		<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}
Hi 1	+	-	+	Hc 1	+	+	+
Hi 2	+	-	+	Hc 3	-	+	+
Hi 3	+	-	+	Hc 4	-	+	+
Hi 4	+	+	+	Hc 9	+	+	+
Hi 8	+	-	+	Hc11	+	+	+
Hi 9	+	-	+	Hc12	+	+	+
Hi 10	+	-	+	Hc15	+	+	+
Hi 11	+	+	+	Hc18	+	+	+
Hi 13	+	+	+	Hc20	+	+	+
Hi 17	+	-	+	Hc21	+	+	+
Hi 20	+	-	+	Hc22	+	+	+
Hi 23	-	-	-	Hc23	-	-	-
Hi 29	+	-	+	Hc25	+	-	+
Hi 38	+	-	+				
Hi 39	+	-	+				
Hi 40	+	-	+				
Hi 41	-	-	+				
Hi 43	-	-	-				
Total (%)	15 (83,3)	3 (16,6)	16 (88,8)	Total (%)	10 (76,9)	11 (84,6)	12 (92,3)

*bla*_{TEM} - beta lactamase tipo TEM; *bla*_{SHV} - beta lactamase tipo SHV; *bla*_{CTX-M} - beta lactamase tipo CTX-M.

ANEXO VI

TABELA 1 - Resultados das pesquisas de sequências gênicas relacionadas aos fatores de virulência apresentados pelas cepas de *K.pneumoniae* do grupo de amostras Hi.

Amostras	Seqüências Gênicas Investigadas					
	<i>mrkA</i>	<i>mrkD</i>	<i>fimA</i>	<i>fimH</i>	<i>KkpsII</i>	<i>iutA</i>
Hi 1	+	+	+	+	-	+
Hi 2	+	+	+	+	-	+
Hi 3	+	+	+	+	-	+
Hi 4	+	+	+	+	-	+
Hi 5	+	-	+	+	-	+
Hi 6	+	+	+	+	-	+
Hi 7	+	+	+	+	-	+
Hi 8	+	+	-	-	-	+
Hi 9	+	-	+	-	-	+
Hi 10	+	+	+	-	-	+
Hi 11	+	+	+	-	-	-
Hi 13	+	+	+	+	+	-
Hi 17	+	+	+	-	+	-
Hi 19	+	+	+	+	-	+
Hi 20	+	+	+	+	-	-
Hi 23	+	+	+	+	-	+
Hi 24	+	+	+	+	-	+
Hi 29	+	+	+	+	-	-
Hi 34	+	+	+	+	-	+
Hi 38	-	-	+	+	-	+
Hi 39	+	+	+	-	-	+
Hi 40	+	+	+	-	-	+
Hi 41	+	-	-	-	-	+
Hi 43	+	+	+	-	-	-
Hi 44	+	-	-	-	-	+
Total	24(96%)	20(80%)	22(88%)	15(60%)	2(8%)	19(76%)

TABELA 2 - Resultados das pesquisas de sequências gênicas relacionadas aos fatores de virulência apresentados pelas cepas de *K.pneumoniae* do grupo de amostras Hc.

Seqüências gênicas investigadas						
Amostras	<i>mrkA</i>	<i>mrkD</i>	<i>fimA</i>	<i>fimH</i>	<i>KkpsII</i>	<i>iutA</i>
Hc 1	+	+	+	+	-	+
Hc 2	+	+	+	+	-	+
Hc 3	+	+	+	+	-	-
Hc 4	-	-	+	+	-	-
Hc 5	+	+	+	+	-	+
Hc 6	+	+	+	+	-	+
Hc 7	+	+	+	-	-	+
Hc 8	+	+	+	-	-	+
Hc 9	+	+	+	-	-	-
Hc 10	+	+	+	-	-	+
Hc 11	+	+	+	-	+	-
Hc 12	+	+	-	-	-	-
Hc 13	+	+	-	-	-	+
Hc 14	-	+	-	-	-	-
Hc 15	+	-	+	+	+	+
Hc 16	+	-	-	-	-	-
Hc 17	+	+	+	+	-	+
Hc 18	+	+	+	+	-	+
Hc 19	+	+	+	+	-	+
Hc 20	+	+	+	+	-	-
Hc 21	+	+	+	+	-	-
Hc 22	+	+	-	-	-	-
Hc 23	+	+	+	-	-	-
Hc 24	+	+	+	+	-	-
Hc 25	+	-	-	-	-	+
Total	23(92%)	21(84%)	19(76%)	13(52%)	2(8%)	13(52%)

TABELA 3 - Resultados das pesquisas de seqüências gênicas relacionadas aos fatores de virulência apresentados pelas cepas de *K.pneumoniae* do grupo de amostras Comunitárias (Co).

Seqüências gênicas investigadas	<i>mrkA</i>	<i>mrkD</i>	<i>fimA</i>	<i>fimH</i>	<i>KkpsII</i>	<i>iutA</i>
Amostras						
Co 2	+	+	+	+	-	+
Co 4	+	+	+	+	-	-
Co 5	-	-	+	+	-	-
Co 7	+	+	+	+	-	-
Co 8	+	-	+	+	-	-
Co 9	+	-	+	+	-	-
Co 11	+	+	+	+	-	-
Co 13	+	+	+	-	-	+
Co 14	+	-	+	+	-	+
Co 16	+	+	+	+	-	-
Co 34	+	-	+	+	-	+
Co 39	-	-	-	-	-	-
Co 47	+	-	-	-	-	+
Co 53	+	-	-	-	-	+
Co 56	+	-	-	-	-	+
Co 59	+	+	-	-	-	-
Co 62	+	+	-	-	-	+
Co 69	-	-	+	+	-	-
Co 71	+	+	+	-	-	+
Co 74	+	+	+	-	-	-
Co 91	-	-	-	-	-	-
Co 99	+	+	+	+	-	-
Co111	-	-	-	-	-	-
Co112	+	-	+	-	-	+
Co120	-	-	+	-	-	-
Total	19(76%)	11(44%)	17(68%)	12(48%)	0(%)	10(40%)

LIV. <u>Decepção do Autor</u>
N. E. _____
DATA <u>22/03/04</u>
PREÇO _____
TOMBAMENTO <u>25/03/04</u>

f: 17806

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Data: <u>22/03/04</u>
Lilacs: _____
Dedalus: <u>1366279</u>
MFN: <u>26392</u>
Terminal: <u>OK</u>