



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE GENES DE RESISTÊNCIA E
VIRULÊNCIA E DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR
ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* MULTIDROGA-RESISTENTES
SUBMETIDOS A ANTIBIÓTICOS

CATARINA FERNANDES DE FREITAS

RECIFE/PE

2014

CATARINA FERNANDES DE FREITAS



**DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE GENES DE RESISTÊNCIA E
VIRULÊNCIA E DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR
ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* MULTIDROGA-RESISTENTES
SUBMETIDOS A ANTIBIÓTICOS**

Dissertação apresentada a Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Alves

RECIFE/PE

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

F866d Freitas, Catarina Fernandes de.
Determinação da presença de genes de resistência e virulência e da capacidade de formação de biofilme isolados de *klebsiella pneumoniae* multidroga-resistentes submetidos a antibiótico / Catarina Fernandes de Freitas. – Recife: O autor, 2014.
121 f. : il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Fábio André Brayner dos Santos.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical.
Inclui referências.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Biofilme. 3. Antibiótico. I. Santos, Fábio André Brayner dos (Orientador). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2014-141)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

CATARINA FERNANDES DE FREITAS

No dia 25 de fevereiro de 2014, às 9h00, na Sala de aula do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (PPGMEDTROP) do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFPE), os Membros Doutores a **Profª. Drª. Ana Catarina de Souza Lopes – Presidente da Banca (UFPE)**, a **Profª. Drª. Janete Magali de Araújo (UFPE)** e o **Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano (UNESP)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguiram a mestranda **Catarina Fernandes de Freitas** sobre a sua Dissertação intitulada **“DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE GENES DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA E DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* MULTIDROGA-RESISTENTES SUBMETIDOS A ANTIBIÓTICOS”**, a qual foi orientada pelo **Prof. Dr. Fábio Brayner dos Santos (UFPE)** e co-orientada pelo **Prof. Dr. Luiz Carlos Alves (CPqAM/FIOCRUZ)**. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profª. Drª. Ana Catarina de Souza Lopes

Profª. Drª. Janete Magali de Araújo

Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano

Profª. Draª. Ana Catarina de Souza Lopes

Profª. Draª. Janete Magali de Araújo

Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Vera Magalhães de Silveira

CORPO DOCENTE PERMANENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Rejane Pereira Neves

DEDICO,

Com carinho à Dyana, Luiz e Fábio.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar em todas as escolhas e por me dar forças para seguir em frente;

À minha mãe pelo amor, compreensão, atenção e apoio, por me ensinar que lutar sempre é o melhor caminho, independente dos obstáculos;

Ao meu pai (in memoriam), pelo amor e incentivo aos estudos;

Aos meus irmãos queridos, Mila e Tom, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em tudo, pelo cuidado e carinho que sempre tiveram comigo;

Aos meus sobrinhos, por toda alegria que me proporcionam;

À minha família pela ajuda e compreensão da minha ausência;

Aos amigos que me ajudaram direta ou indiretamente para conclusão deste trabalho;

À Prof^a Amélia Maciel por me apresentar a pesquisa e despertar meu interesse pelas bactérias;

Aos meus orientadores (Fábio e Luiz), por enxergarem o melhor que há em mim, pelo incentivo, pela paciência, compreensão, cuidado, apoio e dedicação;

À Dyana pela orientação, esforço, paciência, preocupação, cuidado e dedicação;

Aos amigos do LBCM, Grasi, Fernanda, Ana Paula, Duda, Amandinha, Carlmelzinha, Eveline, Gabriel, Will, Nairom, Elverson, Alberon e os demais pelas inúmeras ajudas e momentos não só de trabalho mas também de descontração;

Ao técnico do setor de Microscopia Eletrônica do LIKA/UFPE, Rafael, pela ajuda e paciência;

Ao pessoal da esterilização, Sr. Nelson, Rita, Edson e Felipe.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Tropical, pela presteza e atenção;

Aos professores da pós-graduação, pelos ensinamentos.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

A crescente incidência de isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos e outras classes de antibióticos β -lactâmicos, em casos de infecções relacionadas a assistência a saúde, tem sido amplamente relacionada com a produção de β -lactamases. A necessidade da utilização de dispositivos invasivos como cateteres, em pacientes hospitalizados pode favorecer a colonização destes por diferentes espécies bacterianas, propiciando a formação de biofilmes, o que pode agravar o estado clínico do paciente prejudicando a eficácia terapêutica. O objetivo deste estudo foi detectar a presença dos genes de resistência bla_{SHV} , bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{KPC} ; genes de virulência para produção de cápsula polissacarídica (*cps*), fímbrias do tipo 1 (*fimH*) e tipo 3 (*mrkD*); e a capacidade de formação de biofilme por isolados de *K. pneumoniae* multidroga-resistente (MDR) na ausência e presença de antibióticos. Foram analisados nove isolados de *K. pneumoniae* oriundos de pacientes hospitalizados na cidade de Recife-PE. A concentração inibitória mínima dos antibióticos cefotaxima, ceftazidima e amicacina foi determinada pelo método de microdiluição. Foi feita a tipagem molecular através da técnica de amplificação de sequências intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR). A determinação da presença dos genes foi realizada por PCR convencional. A formação de biofilme foi analisada após inoculação e incubação dos isolados em meio de cultura com um fragmento de catéter na presença e ausência dos antibióticos cefotaxima, ceftazidima e amicacina, além da combinação da ceftazidima e amicacina para os que foram resistentes à amicacina. Os isolados foram processados para microscopia eletrônica de varredura. A genotipagem por ERIC-PCR demonstrou perfis genéticos distintos para os nove isolados. Sete dos nove isolados foram positivos para os genes bla_{TEM} , bla_{SHV} e bla_{KPC} e seis para o gene bla_{CTX-M} . Todos os isolados foram positivos para o gene *cps* e *mrkD* e seis para o gene *fimH*. Todos os isolados formaram biofilme na ausência de antibióticos. Três isolados não formaram biofilme quando submetidos aos antibióticos testados. Em dois isolados a capacidade de formar biofilme melhorou quando

submetidos aos antibióticos. Enquanto que sete dos nove isolados submetidos aos antibióticos, a formação de biofilme foi menor quando comparada com o controle. Embora os isolados sejam resistentes aos antibióticos foi possível observar diminuição do número de células aderidas e a diminuição da formação de biofilme por isolados de *K. pneumoniae* MDR portadores de diferentes β -lactamases e de fatores de virulência, os quais apresentaram comportamentos distintos em relação a formação de biofilme, dependendo do isolado e do antibiótico, podendo este inibir ou induzir uma melhor formação de biofilme.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*. Biofilme. Antibiótico.

ABSTRACT

The increasing incidence of isolates of *Klebsiella pneumoniae* resistant to carbapenems and other classes of antibiotics β -lactam antibiotics in cases of infections related to health care, has been widely linked to the production of β -lactamase . The need for the use of invasive devices such as catheters, in hospitalized patients may favor colonization of such devices by different bacterial species, leading to formation of biofilms, which may worsen the patient's clinical status impairing the treatment efficacy. The aim of this study was to detect the presence of resistance genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} , *bla*_{KPC} ; virulence genes for production of capsular polysaccharide (*cps*), type 1 fimbriae (*fimH*) and type 3 (*mrkD*), and the ability of biofilm formation by isolates of *K. pneumoniae* multidrug-resistant (MDR) in the absence and presence of antibiotics *K. pneumoniae* isolates were used *pneumoniae* derived from patients hospitalized in the city of Recife-PE. The minimum inhibitory concentration of cefotaxime, ceftazidime and amikacin antibiotics was determined by the macrodilution method for all isolates. The nine isolates were subjected to molecular typing by amplification technique of repetitive intergenic sequences of enterobacteria (ERIC – PCR). Determination of the presence of the genes was performed by conventional PCR in all strains. To determine the ability of biofilm formation, all the isolates, individually, were inoculated into flasks containing culture medium and a piece of catheter approximately 1 cm in the presence and absence of clinically relevant concentrations of β -lactam antibiotics (cefotaxime and ceftazidime) and the aminoglycoside amikacin, besides the combination of amikacin and ceftazidime, which were resistant to amikacin. Subsequently, the flasks were placed in a shaker at 37°C for 72h. After this step, catheters were processed for scanning electron microscopy. Genotyping by ERIC-PCR showed distinct genetic profiles for the nine isolates. Seven of the nine isolates were positive for *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} or *bla*_{KPC} and six for the gene *bla*_{CTX-M}. All isolates were positive for *cps* and *mrkD*, and six for *fimH*. All isolates produced biofilm in the absence of antibiotics. Three isolates formed biofilm when subjected to the antibiotics tested. Two isolates the ability to form biofilm was favored when subjected to antibiotics. While seven of the nine isolates submitted to antibiotics, biofilm formation was lower when compared with the control.

Although the isolates are resistant to antibiotics was observed decrease in the number of adhered cells and decreased biofilm formation by isolates of *K. pneumonia* MDR producing different β -lactamases and virulence factors, which showed different behavior in relation to biofilm formation, depending on the isolate and the antibiotic, which may inhibit or induce the formation of biofilm.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*. Biofilm. Antibiotic.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
APÊNDICE A	
Figura 1- Tipagem pela técnica de ERIC-PCR.....	91
Figura 2 - Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura do isolado K483.....	92
Figura 3 - Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura dos isolados K38727 e K952.....	93
Figura 4 - Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura do isolados K3294.....	94
Figura 5 - Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura do isolado K3300.....	95
Figura 6 - Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura do isolado K1.....	96
Figura 7 - Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura dos isolados K39915, K652 e K786.....	97

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Classificação das β -lactamases.....	43

APÊNDICE A

Tabela 1 - Origem e perfil de resistência antimicrobiana dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	90
Tabela 2 - Primers utilizados para detecção dos genes analisados neste estudo.....	90
Tabela 2 - CIM dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> frente os antibióticos cefotaxima, ceftazidima e amicacina e genes de resistência e virulência detectados neste estudo.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC	Amicacina
AmpC	Ampicilinase C
BHI	Brain heart infusion
CAZ	Ceftazidima
CIM	Concentração Inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Centímetro
CMEC	Concentração mínima de eliminação de Biofilme
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CPS	Cápsula polissacarídica
CTX	Cefotaxima
CTX-M	Cefotaximase, primeiramente isolada em Munich
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ESBLs	Extend Spectrum β -Lactamases
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
H	Horas
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IMP	Imipenemase
IrAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
ITU	Infecções do trato urinário
Kb	Quilo base
KDa	Quilodalton
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
M	Molar
mA	Miliamperagem
MBLs	Metalo- β -lactamases
MDR	Multidroga- resistentes
MEC	Matriz extracelular

MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
µg	Micrograma
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OXA	oxacilinase
pb	Par de bases
PBPs	Proteínas fixadoras de Penicilinas
PCR	Polymease Chain Reaction
pH	Potencial de Hidrogênio
Pmol	Picomol
rpm	Rotações por minuto
SHV	Sulphydryl reagent variable
SPM	São Paulo metallo-β-lactamase
Sub- CIMs	Concentrações sub- mínimas inibitórias
TBE	TRIS-borato-EDTA
TEM	Temoneira – Nome proveniente da primeira amostra
U	Unidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UPE	Universidade de Pernambuco
UV	Ultravioleta
V	Volt
VIM	Verona integron-encoded metalo-β-lactamase
W	Watt
Zn	Zinco
µM	Micromolar
µm	Micrometro
µg	Micrograma
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 <i>Klebsiella</i> spp.....	21
2.1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
2.2 Fatores de virulência.....	25
2.2.1 Cápsula polissacarídica (CPS)	25
2.2.2 Fímbrias	27
2.2.3 Biofilmes	31
2.3 Antibióticos β -lactâmicos	36
2.3.1 Classificação dos antibióticos β -lactâmicos	37
2.4 Antibióticos aminoglicosídeos	40
2.5 β -lactamases	41
2.5.1 Classificação das β -lactamases.....	42
3. HIPÓTESE	52
4. OBJETIVOS	53
4.1 Geral	53
4.2 Específicos.....	53
5. METODOLOGIA.....	54
5.1 Isolados bacterianos	54
5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	54
5.3 Extração de DNA	54
5.4 ERIC-PCR.....	55
5.5 Identificação de genes que codificam β -lactamases.....	55
5.6 Amplificação da região promotora para produção de cápsula polissacarídica.....	56
5.7 Detecção dos genes fimbriais <i>fimH</i> e <i>mrkD</i>	56
5.8 Eletroforese em gel de agarose	57
5.9 Formação de biofilme	57
5.10 Microscopia de Varredura (MEV).....	58
6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	59
7. RESULTADOS	60
8. CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICE A.....	82
APÊNDICE B.....	101

1. INTRODUÇÃO

Infecções causadas por isolados de *Klebsiella pneumoniae* com perfil fenotípico de resistência à cefalosporinas de terceira e a carbapenêmicos possuem ampla correlação com a presença de ESBLs (β -lactamases de amplo espectro) do tipo SHV, TEM e CTX-M e mais recentemente geração com a carbapenemase do tipo KPC. Adicionalmente, outras carbapenemases do tipo VIM, IMP e SPM têm sido descritas em isolados de *K. pneumoniae* obtidos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), no entanto, no Brasil ainda são raras (BRADFORD, 2001; PATERSON et al., 2005; QUEENAN; BUSH, 2007; CHONG, ITO, KAMIMURA, 2011; STEINMANN, et al., 2011).

A patogenicidade de isolados de *K. pneumoniae* pode ser aumentada devido a presença de diferentes fatores de virulência, incluindo a produção de cápsula polissacarídica que confere proteção contra a fagocitose e a produção de adesinas fimbriais e não fimbriais que facilitam a aderência bacteriana à superfícies de tecidos específicos e à superfícies abióticas como cateteres, contribuindo para a formação de biofilme nesta espécie bacteriana (STAHLHUT et al., 2012; HENNEQUIN et al., 2012). Diversos estudos têm demonstrado que a presença de fímbrias do tipo 3 em isolados de *K. pneumoniae* permitem a formação de biofilme em superfícies bióticas e abióticas podendo conferir uma maior resistência às respostas imunológicas do hospedeiro e a penetração dos antimicrobianos (JOHNSON, et al., 2011; HANCOCK et al., 2011; SUBRAMANIAN et al., 2012; STAHLHUT et al., 2012; HENNEQUIN et al., 2012; MURPHY & CLEEG, 2012).

O uso de dispositivos médicos invasivos favorece a formação de biofilme por fornecer uma superfície para as adesinas bacterianas se fixarem (STAHLHUT et al., 2012). *K. pneumoniae* tem sido relatada causando infecções relacionadas à dispositivos médicos e à produção de biofilme bacteriano (HOCEVAR et al., 2012; NELSON et al., 2003; SINGHAI et al., 2012). O biofilme é uma forma de vida bacteriana em que há uma maior resistência aos antibióticos, causando muitas vezes infecções persistentes com um tratamento refratário (MAH; O'TOOLE, 2001; DONLAN, 2002). Diante deste problema, estudos têm buscado investigar a ação de drogas em biofilmes, inclusive formas de evitar a sua formação na superfície de

cateteres (SINGLA, HARJAI, CHHIBBER, 2013; WEI et al., 2007; JOHNSON et al., 2011b; GOPAL et al., 2013; TARQUINIO et al., 2013).

Estudos *in vitro*, demonstraram que a exposição de concentrações sub-inibitórias mínimas (sub-CIMs) de antibióticos pode estar associada a uma diminuição na capacidade de formação de biofilme em superfícies de poliestireno. Este fato pode levar a uma maior susceptibilidade ao sistema imunológico e a terapia com antibióticos, o que sugere que esses antibióticos podem não matar a bactéria, nem mesmo causar alterações morfológicas, mas podem afetar as propriedades associadas à virulência bacteriana (POMPILIO et al., 2010; POUR et al., 2011). Outros estudos avaliaram o uso de antibióticos β -lactâmicos em concentrações sub-CIMs na formação de biofilme em isolados de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* produtores de β -lactamases e foi observado que houve a formação de biofilme, o que poderia contribuir para a falha da terapia antimicrobiana (FRANK et al., 2009; WANG et al., 2010; KAPLAN et al., 2012).

Embora existam poucos estudos que descrevam a presença de genes de resistência bacteriana e a capacidade de produção de biofilme, Sowmiya e colaboradores (2012) verificaram que um isolado de *Acinetobacter baumannii* que possuía positividade para o gene bla_{NDM-1} também produzia biofilme. Em isolados de *K. pneumoniae* produtores de biofilme e de ESBLs oriundos de pacientes com infecções relacionadas ao uso de dispositivos médicos foi também detectado a presença do gene bla_{CTX-M} (SHANGAI et al., 2012). Esses estudos mostram que isolados produtores de β -lactamases podem ainda apresentar outro mecanismo de resistência a formação de biofilme. No entanto, não existem estudos que determinem a influência de antibióticos β -lactâmicos na formação de biofilme por isolados de *K. pneumoniae* MDR portadores de genes para produção de ESBLs ou carbapenemases. Diante da alta resistência apresentada pelos isolados bacterianos e da busca por uma terapia adequada, tem-se utilizado alternativamente antimicrobianos em associação para o tratamento dessas infecções de difícil tratamento (PAUL et al., 2014).

Por serem escassos os estudos sobre a presença de genes de resistência e virulência em isolados de *K. pneumoniae* MDR, produtores de diferentes β -lactamases e capazes de formar biofilme, não está elucidada a relação entre a presença desses genes e a formação de biofilme em isolados submetidos ou não a

antibióticos. Portanto, este estudo tem por finalidade verificar a presença de genes de resistência (*bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}) e virulência (*cps*, *fimH* e *mrkD*) e a formação de biofilme em isolados de *K. pneumoniae* MDR quando submetidos ou não a antibióticos β -lactâmicos e ao aminoglicosídeo amicacina sozinho e em associação com a ceftazidima, visando determinar a interferência destes antibióticos na formação do biofilme.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Klebsiella* spp.

O gênero *Klebsiella* spp. pertencente à família Enterobacteriaceae, foi assim denominado por Edwin Klebs, microbiologista alemão no final do século XIX. Este bacilo, também descrito por Carl Friedlander, foi por muito tempo chamado de “bacilo de Friedlander” sendo bastante conhecido como causa de uma pneumonia grave e frequentemente fatal (KONEMAN et al., 2002). Os membros do gênero *Klebsiella* são comumente encontrados no solo e na água (TORTORA et al., 2012). Os sítios comuns de colonização nos humanos por *Klebsiella* spp. são o trato gastrointestinal, respiratório e geniturinário, sendo também encontradas em águas de superfície, plantas e solo e na superfície mucosa dos mamíferos (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; GUPTA, 2007; KONEMAN et al., 2002).

Os membros desse gênero possuem uma cápsula proeminente que é responsável pela aparência mucóide das colônias isoladas e pela virulência aumentada dos micro-organismos *in vivo* (MURRAY et al., 2005). Este gênero possui duas espécies principais *K. oxytoca* e *K. pneumoniae* que são frequentemente isoladas de materiais biológicos humanos (TRABULSI et al., 2008). Alguns isolados são capazes de fixar nitrogênio da atmosfera apresentando uma vantagem nutricional em populações isoladas com pouco nitrogênio protéico em sua dieta (TORTORA et al, 2012).

Embora tenham sido consideradas sem significado clínico e restrita aos ambientes aquático, botânico, e ao solo, *K. terrigena* e *K. planticola* têm sido relatada em amostras clínicas humanas (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). No entanto estas espécies foram reclassificadas taxonomicamente juntamente com a *K. ornithinolytica*, em um novo gênero chamado *Raoultella* (DRANCOURT et al., 2001). *K. variicola*, comum a plantas, é outra espécie que está associada à amostras clínicas (ROSENBLUETH et al., 2004). Outras espécies deste gênero são *K. singaporensis* (LI et al., 2004) e *K. alba* (XU et al., 2010). Assim como *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* encontra-se muitas vezes associada também à resistência aos antimicrobianos (FREITAS et al., 2003; DROPA et al., 2009; DIAS et al., 2011).

Muitas cepas de *Klebsiella* spp. hidrolisam uréia lentamente produzindo uma cor rosa-pálida na superfície inclinada do ágar uréia Christensen. A produção de indol a partir do triptófano pode ser utilizada para diferenciar duas espécies deste gênero, sendo *K. pneumoniae* indol negativa e *Klebsiella oxytoca* indol-positiva, e ambas as espécies imóveis. Em ágar MacConkey as colônias tipicamente são grandes, mucóides e vermelhas com pigmento vermelho que se difunde para o ágar indicando a fermentação de lactose e produção de ácido (KONEMAN et al., 2002).

Dentre as infecções causadas por enterobactérias, *Klebsiella pneumoniae* destaca-se entre os agentes infecciosos nos hospitais sendo a causa de 35.7% de infecções do trato inferior respiratório de pacientes ventilados mecanicamente internados em unidades de terapia intensiva de um hospital no Brasil (MEDELL et al., 2012).

2.1.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria aeróbia facultativa, que apresenta melhor crescimento em condições aeróbias. Apresenta-se como um bacilo não esporulado, imóvel, produz colônias grandes e gomosas quando cultivadas em placas com nutrientes (KONEMAN et al., 2002). No ágar MacConkey, produz colônias róseas, brilhantes, com aspecto elevado e de consistência mucóide. As colônias formadas são grandes devido à cápsula mucóide polissacarídica (Antígeno K) que protege contra a fagocitose por granulócitos, contra a ação de fatores bactericidas do soro e ainda tem função de auxiliar na aderência (MARTINEZ et al., 2000; KONEMAN et al., 2002). Embora seja considerado um patógeno extracelular, vários estudos revelaram a capacidade desta bactéria invadir e persistir nas células epiteliais (OELSCHLAEGGER; TALL, 1997; FUMAGALLI et al., 1997; FAVRE-BONTE et al., 1999; SAHLY et al., 2000, 2008).

Ao contrário de muitos agentes patogênicos bacterianos, *K. pneumoniae* é encontrada em diversos locais da natureza. Os seus habitats não clínicos incluem locais ambientais como a vegetação, o solo, as águas de superfície, bem como a colonização comensal transiente de superfícies mucosas em humanos e outros animais (STAHLHUT et al., 2009). No que diz respeito às propriedades fenotípicas, muitos estudos relataram que os isolados presentes no ambiente são quase idênticos aos isolados clínicos (MATSEN et al., 1974; SEILDLER, 1975;

PODSCHUN; ULLMANN, 1998; PODSCHUN et al., 2000). Sendo indistinguíveis quanto às propriedades bioquímicas, tem sido sugerido inclusive que os isolados ambientais podem ser tão virulentos quanto os clínicos (PODSCHUN et al., 2001; STRUVE; KROGFELT, 2004).

Na primeira metade do século XX, *K. pneumoniae* foi reconhecida como um patógeno pulmonar adquirido na comunidade principalmente entre pacientes com história de alcoolismo crônico. Esta espécie bacteriana também pode estar presente em indivíduos saudáveis, colonizando principalmente o trato intestinal (prevalência de 5 a 38%) e nasofaringe (1 a 6%) de seres humanos (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

Em pacientes hospitalizados pode ocorrer um aumento da prevalência da colonização para 77% em amostra de fezes e 19% na secreção de nasofaringe. Essa colonização pode ser fonte de infecções em indivíduos imunocomprometidos hospitalizados. O trato urinário de crianças e adultos é o sítio mais acometido por infecções causadas por *K. pneumoniae*, seguido por infecções pulmonares graves, septicemias, além de meningites em lactentes (KONEMAN et al., 2002). *K. pneumoniae* é responsável por uma variedade de infecções, tais como pneumonia, septicemia, infecções urinárias e pulmonares, apresentando relevância crescente nas infecções hospitalares, na condição de patógeno oportunista, frequentemente causando infecções em pacientes imunocomprometidos (TRABULSI et al., 2008).

Recentemente, tem sido relatada causando abscessos hepáticos (LIU et al., 2013; MOORE et al., 2013), além de estar relacionada as pneumonias associadas a ventilação mecânica (JONES, 2010) e também a infecções do trato urinário associadas ao uso de cateteres (FRANK et al., 2009). A utilização cada vez mais generalizada de antibióticos contribuiu para que *K. pneumoniae* com fenótipo de multidroga-resistência fosse uma importante causa de infecções relacionadas à assistência à saúde (IrAS) em pacientes imunocomprometidos, sendo responsável por aproximadamente 8% das infecções hospitalares (WILKSCH et al., 2011).

A facilidade em colonizar mucosas privilegia a espécie *K. pneumoniae* como patógeno oportunista, comprometendo, principalmente, o trato urinário e o trato respiratório, causando bacteremia grave e pneumonia aspirativa com altos índices de mortalidade e morbidade. A pneumonia adquirida na comunidade, principalmente por indivíduos etilistas crônicos e com função pulmonar comprometida, acontece na maioria das vezes devido à dificuldade destes pacientes em eliminar as secreções

das vias aéreas superiores, sendo este material, aspirado para as vias aéreas inferiores, propiciando a infecção (TRABULSI et al., 2008).

A facilidade na aquisição de plasmídeos de resistência, através de conjugação bacteriana, faz com que *K. pneumoniae* apresente-se frequentemente resistente à diferentes antimicrobianos, principalmente aos β -lactâmicos, sendo esse um fator limitante e uma das maiores causas de falhas no tratamento das infecções causadas por esta bactéria (TRABULSI et al., 2008). No ambiente hospitalar o número de infecções por *K. pneumoniae* aumentam de acordo com o tempo de internação do paciente. A patogênese das infecções relacionadas à assistência à saúde causada por *K. pneumoniae* tem sido associada à sua capacidade de formar biofilme, o que é preocupante pois muitas vezes esses biofilmes são formados envolvendo dispositivos médicos implantados e as bactérias presentes nesses biofilmes são protegidas dos antibióticos e dos mecanismos de defesa do hospedeiro, dificultando o tratamento do paciente (WILKSCH et al., 2011).

Surtos hospitalares provocados por organismos MDR, como cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs, têm sido relatados em diversos países nos últimos anos, representando uma causa importante de infecções hospitalares adquiridas, especialmente no período neonatal e a taxa de mortalidade pode ser tão alta, atingindo cerca de 70% (MORGAN et al., 1984; GUPTA et al., 2003; GUPTA, 2007; TRABULSI et al., 2008). Cerca de 15-30% dos isolados de *K. pneumoniae* são resistente à cefalosporinas de amplo espectro por possuírem um mecanismo de resistência aos antibióticos mediado por plasmídeos como a produção de β -lactamases (MARTINO et al., 1997). A importância dessa resistência apresentada por isolados de *K. pneumoniae* se traduz principalmente pelas limitações apresentadas na terapêutica dos pacientes acometidos e pelo impacto significativo na prática clínica, já que esses micro-organismos estão relacionados às altas taxas de morbidade, mortalidade e tratamento hospitalar oneroso (TRABULSI et al., 2008).

A capacidade *K. pneumoniae* para prosperar no ambiente e em diferentes locais do corpo está relacionada em grande parte, a sua capacidade intrínseca para regular a expressão de vários fatores de virulência (TARKKANEN et al., 1992; MATATOV et al., 1999; SAHLY et al., 2000). *K. pneumoniae* produz fatores de virulência que contribuem para patogênese bacteriana, incluindo as adesinas fimbriais, sideróforos, antígenos S e antígenos capsulares (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; STRUVE; KROGFELT, 2004). Os fatores de virulência que predominam em *K.*

pneumoniae são a produção de cápsula polissacarídica e as fímbrias (TARKKANEN et al., 1992; MATATOV et al., 1999; SAHLY et al., 2000).

A morbidade e mortalidade produzida por *K. pneumoniae* está relacionada principalmente à resistência a antimicrobianos e sua capacidade de formar biofilmes (BARRETO et al., 2009). Muitas vezes essas infecções estão associadas à formação de biofilme por esta espécie bacteriana (SINGHAI et al., 2012; NIVEDITHA et al., 2012). Alguns estudos tem analisado a formação de biofilme por *K. pneumoniae*, inclusive a penetração de antibióticos e a susceptibilidade. Esses estudos mostraram a limitada capacidade de penetração dos antibióticos ampicilina e ciprofloxacina e que a resistência à gentamicina não é aumentada em biofilmes (ANDERL et al., 2000; MAGESH et al., 2013; TRENTIN et al., 2013; NAPARSTEK et al., 2014). Alguns compostos naturais vêm sendo estudados para impedir a formação de biofilme, uma ação bacteriostática, observada através da diminuição da matriz extracelular em imagens de microscopia eletrônica de varredura (TRENTIN et al., 2013; MAGESH et al., 2013).

2.2 Fatores de virulência

2.2.1 Cápsula polissacarídica (CPS)

O termo cápsula é frequentemente empregado para descrever camadas polissacarídicas, restringindo-se a uma camada que fica ligada à parede celular da bactéria como um revestimento externo de extensão limitada e estrutura definida (MIMS et al., 1999; TORTORA et al., 2012; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). A CPS consiste numa camada de superfície elaborada por polissacarídios associados, cuja composição é muito dependente do organismo, podendo ser espessa ou delgada, rígida ou flexível de acordo com sua natureza química, associando-se de maneira compacta ou frouxa à parte externa da parede celular, onde o material capsular frouxamente associado também pode ser chamado de glicocálice (KONEMAN et al., 2002). No entanto, se as camadas forem rígidas e organizadas em uma matriz compacta, que exclui partículas como a tinta naquim, tal forma é referida como cápsula (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Quase todos os membros da família Enterobacteriaceae são capazes de produzir cápsula e esta propriedade tem sido fortemente associada à infecções

extra-intestinais, tais como meningite, septicemia e infecções do trato urinário (KORHONEN et al., 1985; TARKKANEN et al., 1992; SAHLY et al., 2008).

Klebsiella pneumoniae frequentemente produz CPS, antígeno e lipopolissacarídeo (LPS, ou antígeno O), sendo ambos importantes fatores de virulência. A grande maioria dos isolados de *K. pneumoniae* expressam grande quantidade de CPS que cobre toda a superfície da bactéria, resultando em um fenótipo mucóide característico quando cultivadas em placas de ágar (KONEMAN et al., 2002; STRUVE; KROGFELT, 2004). A CPS é um dos mecanismos de virulência mais importante e essencial para colonização do trato urinário pela espécie *K. pneumoniae* (CAMPOS et al., 2004; REGUÉ et al., 2004).

A CPS desempenha um papel crítico na proteção de isolados de *K. pneumoniae* contra mecanismos de defesa do hospedeiro, principalmente, quando estas bactérias estão presentes no sangue, já que a cápsula faz com que essas bactérias consigam escapar da fagocitose e de substâncias bactericidas presentes no soro (WILLIAMS et al., 1983; PODSCHUN et al., 1992; DOMENICO et al., 1994; SCHEMBRI et al., 2005; SAHLY et al., 2008). A CPS inibe a ativação ou absorção dos componentes do sistema complemento principalmente C3b, inibem também a diferenciação e a capacidade funcional dos macrófagos *in vitro*. As CPSs são classificadas em 77 sorotipos, dentre os quais se destacam K1 e K2, pois as cepas que apresentam esses sorotipos apresentam uma maior virulência quando comparada as possuidoras dos outros sorotipos (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). Estudos têm mostrado que o sorotipo capsular parece não influenciar na resistência à fagocitose, mas sim a quantidade de CPS expressa (PAN et al., 2008; MARCH et al., 2013).

A CPS impede a expressão de β -defensinas das células epiteliais respiratórias (MORANTA et al., 2010), neutraliza atividade de peptídeos antimicrobianos (LLOBET et al., 2008). Além disso, sugere-se que por dificultar a ligação e internalização da bactéria, a CPS induz uma resposta imunológica defeituosa, inclusive a maturação das células dendríticas e a produção de citocinas pró-inflamatórias Th1 (EVRARD et al., 2010). Alguns estudos verificaram que a presença de antibióticos como polimixina, ceftazidima e ciprofloxacina podem estimular a produção de CPS (HELD et al., 1995; CAMPOS et al., 2004).

Diante da importância da CPS para a virulência bacteriana, alguns estudos têm sido realizados em busca de drogas anti-virulência. Neste contexto, um inibidor

da produção de CPS foi relatado e embora não atue diminuindo o crescimento bacteriano pode reduzir a infectividade dos patógenos (BENGHEZAL et al., 2007; RASKO; SPERANDIO, 2010; STANDISH et al., 2012).

As bactérias encapsuladas escapam da fagocitose, pois a natureza química da cápsula parece impedir que as células fagocíticas se fixem à bactéria (MIMS et al., 1999; TORTORA et al., 2012). Assim a perda da CPS pode resultar na perda do poder de evasão da fagocitose e em alguns casos da patogenicidade da bactéria. A CPS possui receptores específicos que servem como sítios de ligação à outras superfícies, favorecendo a formação de biofilmes aderidos à diferentes superfícies, assim como um aumento do poder infectante de alguns tipos de bactérias. Por serem formadas por macromoléculas muito hidratadas, servem como proteção contra dessecação do meio, podendo também constituir fonte de nutrientes (MIMS et al., 1999; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; TORTORA et al., 2012). Para a *Escherichia coli* uropatogênica, a CPS parece ser essencial para formação de biofilme (GOLLER; SEED, 2010). Sendo assim, a cápsula bacteriana tem diversas funções: protege a célula da desidratação e de materiais tóxicos do ambiente (íons de metais, radicais livres) e promove a concentração de nutrientes na superfície da célula bacteriana devido a sua natureza polianiônica. Além disso, a cápsula também pode contribuir para aderência das bactérias às células e à superfícies mucosas. Essa aderência é necessária para muitos micro-organismos para o estabelecimento de infecções em hospedeiros apropriados.

2.2.2 Fímbrias

As fímbrias são estruturas similares aos flagelos, mas sem qualquer envolvimento na motilidade, sendo consideravelmente mais curtas, medindo de 3 a 25 nm de diâmetro e de 10 a 20 µm de comprimento, e mais numerosas que os flagelos. Assim como os flagelos, as fímbrias são constituídas de proteínas, como a fimbrilina ou pilina. As fímbrias funcionam como organelas celulares para fixação às células e/ou superfícies mucosas; sendo frequentemente denominadas adesinas (KONEMAN et al., 2002). Fortes evidências sugerem que as fímbrias conferem capacidade de adesão microbiana às superfícies, incluindo tecidos animais no caso

de algumas bactérias patogênicas ou a formação de películas ou biofilmes em superfícies abióticas (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

A adesão microbiana aos tecidos hospedeiros é uma etapa extremamente necessária ao desenvolvimento da infecção (TORTORA et al., 2012; STRUVE et al., 2009). Nesta etapa as adesinas fimbriais se unem especificamente à receptores moleculares na superfície das células, facilitando a aderência aos tecidos específicos do hospedeiro (KLEMM; SCHEMBRI, 2000; TORTORA et al., 2012). As adesinas podem estar localizadas no glicocálice do microrganismo ou em outras estruturas como pili, fímbrias e flagelos (TORTORA et al., 2012).

Já foi mostrado que a fixação das bactérias aos cateteres é iniciada por adesinas, como as fímbrias, presentes na superfície bacteriana contribuindo para formação de biofilmes nestes dispositivos (JACOBSEN et al., 2008).

Muitas adesinas apresentam ligação do tipo lectina à resíduos de carboidratos terminais, como por exemplo à manose. A aderência de bactérias entéricas à superfícies mucosas, que é mediada por fímbria tipo 1, pode ser inibida com a pré-incubação das bactérias com manose, onde esta liga-se a porção terminal da adesina, bloqueando sua aderência; por essa razão as fímbrias do tipo 1 são referidas como sensíveis a manose (KONEMAN et al., 2002).

K. pneumoniae produz, principalmente, dois tipos de fímbrias, as do tipo 1 e do tipo 3 (GERLACH et al., 1989). São estruturalmente e mecanicamente diferentes, estando essas diferenças atreladas provavelmente as funções que desempenham (CHEN et al., 2011). Essas fímbrias são constituídas, principalmente, por monômeros de estrutura principal proteica, com massa molecular média de 20 kDa e subunidades de adesinas, sendo as estruturas monoméricas principais *FimA* e *mrkA* nas fímbrias do tipo 1 e 3, respectivamente, e as subunidades de adesina principais *fimH* ou *mrkD*, podendo ser codificados por genes cromossômicos e plasmidiais (SHARON, 1987; WITKOWSKA et al., 2005).

As fímbrias do tipo 1 são manose-específicas, expressas em muitas espécies de enterobactérias, enquanto que as do tipo 3 são específicas para o colágeno IV e V, e encontram-se presentes na maioria dos isolados de *Klebsiella* (FADER; DAVIS, 1980; FADER et al., 1981; WITKOWSKA et al., 2005). Outros gêneros, além de *Klebsiella*, também expressam fímbrias do tipo 3 como *Providencia*, *Proteus*, *Enterobacter* e *Serratia* (STRUVE et al., 2009).

As fímbrias do tipo 1, que são presentes em *Klebsiella* tem sido mais extensivamente estudada em *Escherichia coli*, mas sabe-se que as estruturas fimbriais do tipo 1 em *K. pneumoniae* são homólogas às de *E. coli* em relação à composição da regulação gênica (FADER; DAVIS, 1980; FADER et al., 1981; GERLACH et al., 1989; WITKOWSKA et al., 2005; STRUVE et al., 2009). As fímbrias do tipo 1 são finas, rígidas, bastante comuns em espécies da família Enterobacteriaceae, expressas por diversas espécies desempenhando um papel importante na patogênese bacteriana (KLEMM; SCHEMBRI, 2000; OFEK, ITZHAK et al., 2003; SAHLY et al., 2008).

As fímbrias do tipo 1 exercem as suas propriedades adesivas em virtude da adesina *fimH*, um componente menor localizado na ponta da fímbria (CHOUDHURY, 1999). A adesina *fimH* reconhece manose contendo glicoproteínas que estão presentes em muitos tecidos do hospedeiro mamífero, tais como a superfície do aparelho urinário. Isto permite que as bactérias se fixem e eventualmente colonizem o uroepitélio (CONNELL et al., 1996; MULVEY, 1998; MARTINEZ et al., 2000). Dessa forma, as fímbrias do tipo 1 desempenham um papel importante na infecção do trato urinário (ITU) causadas por *E. coli* e *K. pneumoniae* (SAHLY et al., 2008). Além disso, as fímbrias do tipo 1 promovem a adesão e invasão bacteriana e também a formação de biofilmes, as quais são características intimamente associadas com a virulência bacteriana (SCHEMBRI et al., 2005). Ambas as fímbrias do tipo 1 e 3 estão expressas na formação do biofilme (STAHLHUT et al., 2012). No entanto, segundo alguns autores, as fímbrias do tipo 3 contribuem fortemente para formação de biofilmes (SCHEMBRI et al., 2005; STRUVE et al., 2009), já as do tipo 1 não (SCHROLL et al., 2010).

As fímbrias do tipo 3 medem 2-4 nm de largura e 0,5-2 µm de comprimento, predominantemente compostas por uma proteína de subunidade grande MrkA, além da adesina MrkD (ALLEN et al., 1991). Estas fímbrias do tipo 3 pertencem à classe das fímbrias “usher chaperone” codificadas pelo *cluster* gênico Mrk, o qual inclui o gene MrkA que codifica a subunidade principal fimbrial e o MrkD codifica a adesina fimbrial responsável pela aglutinação de eritrócitos pelo mecanismo manose resistente (STRUVE et al., 2009).

As fímbrias do tipo 3 são capazes de mediar a ligação de *Klebsiella* spp. à diversas células humanas, tais como as endoteliais e epiteliais do trato respiratório e urinário (MAAYAN et al., 1985; HORNICK et al., 1991, 1992, 1995; TARKKANEN et

al., 1997; SAHLY et al., 2008b; STRUVE et al., 2009). Esse tipo de fímbrias podem mediar a ligação ao tecido alvo utilizando a adesina *MrkD* que está associado com a proteína fimbrial *MrkA*. A formação de biofilmes *in vitro* por isolados de *K. pneumoniae* foi influenciada pela produção de fímbrias na superfície bacteriana, facilitando a formação do biofilme. No entanto, a proteína *MrkD* parece não ser necessária para uma rápida e eficiente formação de biofilme, embora seja requerida para adesão às proteínas da matriz extracelular. O principal componente estrutural da fímbria do tipo 3 (*MrkA*) é uma proteína hidrofóbica, e sua hidrofobicidade pode facilitar as interações bacterianas que conduzem à um crescimento eficiente como biofilme (LANGSTRAAT et al., 2001). O gene *mrkD* demonstrou mediar a adesão às estruturas de colágeno (STRUVE et al., 2009). Contraditoriamente, um estudo mostrou que as infecções pulmonares e do trato urinário não estão associadas à expressão de fímbrias do tipo 3 (ONG et al., 2008).

As fímbrias do tipo 3 parecem desempenhar duas funções importantes para a bactéria, a de promover a interação com receptores específicos das células e tecidos do hospedeiro e a de facilitar o crescimento da bactéria como biofilme (LANGSTRAAT et al., 2001).

A CPS e as fímbrias são proeminentes componentes estruturais da superfície celular de *K. pneumoniae* e desempenham papéis importantes na sua sobrevivência e patogenicidade. No entanto, alguns estudos relatam a interferência da CPS em outros mecanismos de virulência como as fímbrias e formação de biofilmes. Isolados encapsulados apresentam uma menor quantidade de adesinas, podendo ser a CPS responsável por uma inibição parcial da adesão à células epiteliais, já que as mesmas parecem interagir de alguma forma nos estágios finais da montagem fimbrial, interferindo na biossíntese da adesina (FAVRE-BONTE et al., 1999). Esta relação também foi verificada por outros autores, em que os isolados encapsulados aderiram mal à células epiteliais e apresentaram menor poder de invasão (SAHLY et al., 2000), indicando que a função das fímbrias pode ser prejudicada devido à presença da CPS. Adicionalmente, foi demonstrado que a CPS interfere, mas não anula o funcionamento das fímbrias, pois não afeta a quantidade de fímbria produzida. A presença da CPS parece impedir que a fímbria tipo 1 inicie a formação do biofilme, já que a inibição da síntese da cápsula melhora o funcionamento desta fímbria (SCHEMBRI et al., 2005).

No entanto, há relatos conflitantes na literatura quanto a expressão simultânea de CPS e fímbrias por *K. pneumoniae*, onde numa investigação preliminar, onde foi relatado que de 32 isolados encapsulados de *K. pneumoniae* provenientes de ITU, 29 foram capazes de expressar fímbria do tipo 1 (TARKKANEN et al., 1992). Por outro lado, Matatov et al. (1999) identificaram uma relação inversa entre cápsula e a expressão de um tipo de fímbria. Eles examinaram um painel de isolados de *K. pneumoniae* derivados de sepses e de ITU e mostraram que os isolados de sepse encapsulados não produziram as fímbrias de tipo 1, enquanto que a maioria dos isolados de ITU que expressavam as fímbrias do tipo 1 não eram encapsulados. Esses dados indicam que os isolados encapsulados são incapazes de expressar fímbrias funcionais.

2.2.3 Biofilmes

A existência dos biofilmes já é conhecida há algum tempo. Zobell em 1943, foi provavelmente o primeiro a registrar essa observação em detalhes (CHARACKLIS; MARHALL, 1990; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994), ele sugeriu que o processo de colonização microbiana ocorre em duas etapas: uma fase inicial reversível seguida por uma ligação irreversível entre a célula e a superfície (CHARACKLIS; MARHALL, 1990). Após esse estudo inicial, muitos pesquisadores têm demonstrado a existência dos biofilmes em diversos ambientes em cascos de navios, sistemas de distribuição de água e petróleo, cáries dentais, dispositivos e implantes médicos (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994). Em, 1992, os biofilmes foram definidos como micro-organismos imobilizados à uma superfície de substrato, geralmente incorporado em uma matriz polimérica orgânica originada por bactérias, podendo reter substâncias inorgânicas no interior da matriz (COSTERTON et al., 1994; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; COSTERTON, 1999).

O biofilme é uma estrutura porosa e complexa formada por uma ou mais espécies de micro-organismos presos à uma superfície ou substrato, onde as bactérias formam microcolônias circundadas de grande quantidade de exopolissacarídeos. Entre as microcolônias existem canais para abastecimento de água que promovem o influxo de nutrientes e o efluxo de produtos de metabolismo. Análises bioquímicas da estrutura dos exopolissacarídeos revelam que os biofilmes

são hidro-géis (CORONA-IZQUIERDO; MEMBRILLO-HERNÁNDEZ, 2002; HALL-STOODLEY et al., 2004).

Portanto, os biofilmes são compostos principalmente de células microbianas e de uma matriz composta principalmente por um aglomerado de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Essa matriz polimérica pode variar em propriedades químicas e físicas, mas é principalmente composta por polissacarídeos. Os biofilmes que crescem sobre dispositivos médicos, parecem ser compostos de um único organismo associado à EPS (DONLAN, 2002; TORTORA et al., 2012).

A formação dos biofilmes pode ser benéfica ou prejudicial ao ambiente em que se formam. Na indústria de processamento de alimentos a formação de biofilmes pode ser benéfica, como é o caso da fabricação de vinagre onde o crescimento dos microrganismos aumenta a área de superfície favorecendo a conversão do substrato em produto (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

Células crescidas em biofilme apresentam algumas propriedades distintas das células planctônicas, uma delas é a resistência aumentada aos antimicrobianos (MAH; O'TOOLE, 2001). A estrutura química e física dos biofilmes ou outros aspectos da arquitetura do biofilme podem ser responsáveis por conferir essa resistência elevada, já que as células no centro de biofilmes ficam protegidas de forças químicas e físicas tais como de antibióticos e de descamação (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

As células que existem num biofilme, podem se tornar 10-1000 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos que as planctônicas, causando um enorme impacto na medicina, já que tem sido estimado que os biofilmes estejam associados à 65% das infecções nosocomiais, os quais apresentam empecilhos na terapia antimicrobiana elevando os custos do tratamento destas infecções (MAH; O'TOOLE, 2001). Estudos indicam que a maioria dos cateteres vasculares são colonizados por microrganismos presentes em biofilmes (TORTORA et al., 2012).

A matriz exopolissacarídica (ou outros componentes dos biofilmes) não forma uma barreira impenetrável à difusão de agentes antimicrobianos. No entanto, para certos compostos, a matriz de exopolissacarídeo representa uma barreira inicial que pode dificultar a penetração do agente antimicrobiano (MAH; O'TOOLE, 2001).

Células crescidas em biofilmes passam por uma limitação nutricional o que pode causar alterações fisiológicas gerando um *stress* na bactéria, a resposta à

esse estresse seria a formação de biofilmes para se fortalecerem diante da depleção nutricional, induzindo um crescimento lento das bactérias presentes em biofilmes maduros e geralmente aumentando a resistência aos antibióticos (MAH; O'TOOLE, 2001). Além disso, a estrutura do biofilme promove um ambiente ideal para troca de DNA extracromossomal, pois devido à proximidade maior das células a conjugação ocorre melhor entre células no biofilme do que em células planctônicas. Dessa forma, os organismos dentro de biofilmes podem facilmente adquirir resistência através da transferência de plasmídeos de resistência (DONLAN, 2002).

A adaptação genética dos micro-organismos é fundamental para sua sobrevivência e pode ter origem quer em mutações ou recombinações dentro do seu próprio genoma, quer na aquisição de novo material genético proveniente de outros micro-organismos, onde a formação de biofilme facilita essa adaptação a novos ambientes (AZEVEDO; CERCA, 2012). Fatores ambientais podem promover a formação de biofilme bacteriano contribuindo positivamente para a resistência antimicrobiana (POOLE, 2012). Adicionalmente, tem sido mostrado que sub-CIMs de antibióticos podem induzir a formação de biofilme bacteriano. Sub-CIMs de antibióticos β -lactâmicos induzem significativamente à formação de biofilmes em algumas cepas de *S. aureus* (KAPLAN et al., 2012). Resultado semelhante foi obtido com um isolado de *K. pneumoniae* portador do gene *bla*_{CTX-M-15}, quando submetido à cefotaxima em baixas concentrações (HENNEQUIN et al., 2012). A clorexidina e o cloreto de benzalcônio em concentrações usadas convencionalmente inibiram a formação de biofilme de diferentes espécies bacterianas. No entanto, quando utilizadas em sub-CIMs foram capazes de induzir a formação de biofilme por *S. epidermidis*. Portanto, a exposição subletal de antissépticos catiônicos podem contribuir para persistência de estafilococos devido à indução da formação de biofilmes por essas substâncias, o que é preocupante já que o uso inadequado destes antissépticos podem promover a formação desses biofilmes. Exposição subletal aos biocidas podem contribuir não só para o desenvolvimento da resistência e promoção da resistência cruzada a uma variedade de agentes antimicrobianos em bactérias Gram-negativas, mas também para a persistência de estafilococos através da indução de biofilme. *K. pneumoniae* na presença de cloreto de benzalcônio teve seu crescimento planctônico inibido por uma concentração quatro vezes menor quando comparada a inibição do desenvolvimento do biofilme (HOUARI; MARTINO; DI, 2007).

O uso generalizado de antibióticos como promotores de crescimento na agropecuária pode expor as bactérias a baixos níveis das drogas. Recentemente foi verificado que níveis baixos de β -lactâmicos, uma classe amplamente utilizada em ambientes clínicos e agrícola causou uma autoagregação significativa e a formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* (KAPLAN et al., 2012).

Biofilmes microbianos têm sido associados a uma variedade de infecções persistentes que respondem fracamente a terapia com antibióticos convencionais. Nos biofilmes a difusão do antibiótico é prejudicada, há um aumento das taxas de mutação e da troca de genes responsáveis pela resistência aos antibióticos. Diante disso, uma correlação significativa entre a produção de biofilme e resistência à múltiplas drogas foi estabelecida, onde 80% das cepas produtoras de biofilme eram MDR (SUBRAMANIAN et al., 2012).

Nos seres humanos, a susceptibilidade à infecções das vias aéreas por *K. pneumoniae* é mais frequentemente associada a fatores predisponentes do indivíduo. Durante infecções secundárias, superfícies epiteliais esfoliadas e desnudadas podem expor receptores de colágeno que permitem a aderência de *K. pneumoniae* mediada pela adesina MrkD. O crescimento subsequente nesses locais, sob a forma de biofilmes pode permitir que as bactérias evitem sua fagocitose pelos macrófagos alveolares. Para pacientes com tubo endotraqueal, as fímbrias do tipo 3 podem ter um papel duplo no processo infeccioso, onde imediatamente após a inserção destes dispositivos a natureza hidrofóbica da porção da fimbria tipo 3 poderia facilitar a fixação as superfícies destes tubos com subsequente crescimento microbiano neste dispositivo. Portanto, um segundo papel das fímbrias do tipo 3 nestes tipos de infecção seria promover uma interação entre o receptor específico das proteínas da matriz e a adesina MrkD que promove a aderência aos tubos (JAGNOW, 2003).

Além disso, a formação de biofilmes, principalmente em *K. pneumoniae* está relacionada à fatores de virulência como a presença de cápsula e fímbrias do tipo 1 e do tipo 3. Esta relação vem sendo descrita em estudos juntamente com outros fatores que parecem influenciar a formação de biofilme. Segundo SCHROLL et al. (2010) a formação *in vitro* do biofilme pode ser influenciada pelo meio de cultura, no entanto não foi observado a correlação entre a quantidade de biofilme formado e a composição do meio, quanto à quantidade de nutriente.

Adicionalmente, o crescimento do biofilme mediado por fímbrias de tipo 3 parece ser importante para a sobrevivência destes organismos nas superfícies de cateteres e no ambiente hospitalar (ONG et al., 2008). Contraditoriamente, alguns autores demonstraram que ambas as fímbrias do tipo 1 e do tipo 3 tem sido associadas à aderência de *K. pneumoniae* aos cateteres e que essas fímbrias favoreceram a formação de biofilme pelos isolados de *K. pneumoniae* (STAHLHUT et al., 2012). Essa contradição indica que o papel da fímbria tipo 1 na formação do biofilme ainda não está bem elucidado. Essas fímbrias já foram encontradas também em outras espécies causadoras de infecções associadas ao uso de cateteres incluindo *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, e *E. coli*, sendo portanto, possível que nessas outras espécies elas estejam associadas também à formação de biofilmes (STAHLHUT et al., 2012).

Um estudo verificou que isolados de *K. pneumoniae* mutantes com inserções de transposons dentro do loci *wza* e *wzc* da CPS foram deficientes na formação de biofilme (WU et al., 2011). Já foi identificada uma proteína envolvida na biossíntese de cápsula, que é essencial para a formação de biofilme por *K. pneumoniae* (BODDICKER et al., 2006). Genes da CPS, como *wza* e *ORF14* são importantes para a formação de biofilme fase inicial por *K. pneumoniae* (BALESTRINO et al., 2008).

LEE et al. (2008) verificaram que isolados de *Acinetobacter baumannii* que possuíam o gene que codifica para produção da β -lactamase PER-1 formaram biofilme em maior quantidade do que os isolados sem o gene que confere a produção dessa β -lactamase.

Os antibióticos podem promover a formação de espécies reativas ao oxigênio o que contribui para a morte celular. Esses antibióticos que promovem a formação de ROS (espécies reativas ao oxigênio) podem inibir o desenvolvimento de biofilme por *E. coli* (KUCZYŃSKA-WIŚNIK et al., 2010). Em outro estudo foi possível observar que o anticoagulante EDTA reduziu em 55-65% a formação de biofilme por isolados de *A. baumannii* produtores de β -lactamase (LEE et al., 2008).

Além de estudos realizados avaliando a ação de antibióticos em biofilmes (CIRIONI et al., 2011; TARQUINIO et al., 2013), Trentin et al. (2013) mostraram que plantas medicinais, como a encontrada na região da Caatinga, podem atuar inibindo o crescimento do biofilme formado por *Staphylococcus epidermidis*.

Recentemente, tem sido demonstrado que a sinalização célula-a-célula desempenha um papel na adesão celular e portanto na formação de biofilmes (DONLAN, 2002). A regulamentação da formação de biofilme em *K. pneumoniae* é complexa e envolve vários mecanismos de regulação. *Quorum sensing* modula a formação de biofilme através da síntese de lipopolissacarídeo em *K. pneumoniae* (ARAUJO et al., 2010).

A utilização de bloqueadores desse sinal de *quorum sensing* para atenuar patogenicidade bacteriana tem sido pensada como uma alternativa bastante atraente, principalmente diante da emergência de bactérias MDR (ANBAZHAGAN et al., 2012). Além disso, tem sido sugerido também que os processos de desenvolvimento e diferenciação de microcolônias podem ser de grande interesse como alvos para novas estratégias para controlar o biofilme; já que a morte celular programada, uma característica essencial de organismos superiores, pode também desempenhar um papel fundamental na diferenciação celular e desenvolvimento contínuo de microcolônias de procariotos (WEBB et al., 2003).

2.3 Antibióticos β -lactâmicos

O surgimento da quimioterapia moderna é creditado aos esforços de Paul Erlich, na Alemanha, durante a primeira metade do século XX, quando ele especulou sobre uma “bala mágica” que pudesse destruir seletivamente os patógenos sem danificar os tecidos do hospedeiro. Em 1928, Alexander Fleming, observou que o crescimento de bactérias era inibido próximo às colônias de um fungo que havia contaminado a placa de *Petri*. O componente ativo do fungo, *Penicillium notatum*, foi denominado penicilina, surgindo então o primeiro antibiótico. Em 1940, Florey e Chain obtiveram sucesso com o primeiro teste clínico da penicilina (TORTORA et al., 2012). Os antibióticos são definidos como compostos químicos produzidos por micro-organismos que inibem ou matam outros micro-organismos. Já os agentes antimicrobianos correspondem a um produto químico sintético ou natural que mata ou inibe o crescimento de micro-organismos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Um dos principais tipos de antibióticos, tanto do ponto de vista histórico quanto médico, corresponde ao grupo dos β -lactâmicos que incluem as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenêmicos e cefamicinas, todos com

aplicação médica. Os antibióticos β -lactâmicos formam um grupo de antibióticos que contém em sua estrutura o anel β -lactâmico heterocíclico de quatro membros (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Esses antibióticos são prescritos com frequência, compartilhando uma estrutura e mecanismo de ação comum: a inibição da síntese da parede celular bacteriana formada por peptidoglicanos (GOODMAN; GILMAN, 1996). Em suas estruturas químicas, todos os β -lactâmicos tem um elemento estrutural farmacotrófico em comum, o anel azetidinona de quatro membros ou anel β -lactâmico, que na maioria dos antibióticos esse anel central é fundido a outro anel de cinco (tiazolidínico) ou seis membros (dihidrotiazínico), formando as penicilinas ou cefalosporinas, respectivamente (GUIMARÃES et al., 2010).

2.3.1 Classificação dos antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos representam uma família de agentes antimicrobianos que pode ser dividida em quatro grandes classes, variando quanto ao seu espectro de ação: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Existem mais de 40 antibióticos β -lactâmicos diferentes registrados para uso clínico. Alguns como a penicilina são ativos principalmente contra bactérias Gram-positivas enquanto outros foram desenvolvidos com atividade contra bacilos Gram-negativos, como as enterobactérias. Apenas os β -lactâmicos de última geração são ativos contra *Pseudomonas aeruginosa* (MIMS et al. 1999). Os grupos diferem entre si pelos anéis adicionais (anel tiazolidina de penicilinas, núcleo cephem de cefalosporinas, nenhum anel para monobactâmicos, estrutura do anel duplo para carbapenêmicos). A diferença dos antibióticos em cada grupo consiste na natureza de uma ou duas cadeias laterais (SAMAH-KFOURY; ARAJ, 2003).

O maior número de antibióticos β -lactâmicos em uso clínico pertence à classe das cefalosporinas, que estão subdivididas em 1^a, 2^a, 3^a e 4^a geração em função do espectro de ação frente à bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (GUIMARÃES et al., 2010).

As cefalosporinas são semelhantes às penicilinas, diferenciando-se estruturalmente por apresentarem um anel dihidrotiazoina de seis membros em vez de um anel de tiazolidina de 5 membros (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Elas atuam da mesma forma que as penicilinas, inibindo a síntese da parede celular bacteriana, por ligar-se irreversivelmente às PBPs, impedindo a ligação cruzada do peptidoglicano essencialmente da mesma forma que as penicilinas. No entanto, as cefalosporinas diferenciam-se destas por serem resistentes às penicilinas e serem efetivas contra um número maior de micro-organismos Gram-negativos do que as penicilinas naturais. Todavia são suscetíveis a um grupo diferente de β -lactamases (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; TORTORA et al., 2012). A cefotaxima foi a primeira das cefalosporinas de 3^a geração a ser disponibilizada nos EUA, sendo resistente à diversas β -lactamases, mas não às ESBLs. A cefoperazona é menos ativa do que a cefotaxima contra micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos. Porém, contra *P. aeruginosa* é mais ativa do que a cefotaxima e menos ativa que a Ceftazidima (GOODMAN; GILMAN, 1996). A ceftazidima tem um oitavo da atividade da cefotaxima, em relação aos micro-organismos Gram-positivos. Sua atividade contra espécies da família Enterobacteriaceae é bastante semelhante à da cefotaxima, diferenciando-se por apresentar boa atividade contra *Pseudomonas*, onde segundo testes *in vitro*, é mais ativa que a cefoperazona e a cefotaxima (GOODMAN; GILMAN, 1996).

O monobactâmico, Aztreonam, é um antibiótico sintético que possui apenas um anel simples, diferente do anel duplo convencional dos β -lactâmicos, apresenta atividade frente à micro-organismos Gram-positivos e bactérias anaeróbias, sendo seu espectro de ação comparável à compostos relacionados à penicilinas (TORTORA et al., 2012).

Já os carbapenêmicos têm um espectro antimicrobiano mais amplo, substituindo um átomo de carbono por um de enxofre e acrescentam uma ligação dupla ao núcleo da penicilina (GOODMAN; GILMAN, 1996; TORTORA et al., 2012). O imipenem é o agente carbapenêmico mais ativo contra uma ampla gama de espécies bacterianas, apresentando uma excelente ação frente às enterobactérias (GOODMAN; GILMAN, 1996). Os carbapenêmicos atualmente representam a droga de escolha para tratamento de infecções graves causadas por isolados MDR, que são prevalentes em muitas espécies bacterianas Gram-negativas, especialmente as que produzem ESBLs e/ou AmpC. No entanto, a resistência à carbapenêmicos está sendo cada vez mais detectada, estando principalmente relacionada com a ação de enzimas do tipo carbapenemase.

2.3.1.1 Mecanismo de ação dos antibióticos β -lactâmicos

O componente estrutural mais importante das paredes celulares bacterianas é a camada de peptidoglicano. Sua estrutura básica é uma cadeia de 10 a 65 resíduos de dissacarídeos consistindo em moléculas alternadas de ácido N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico. Essas cadeias são então interligadas por pontes peptídicas que criam uma cobertura reticular rígida para as bactérias. A construção das cadeias de ligações cruzadas é catalisada por enzimas específicas (por exemplo, transpeptidases, carboxipeptidases, endopeptidases). Essas enzimas reguladoras são também denominadas proteínas de ligação à penicilina (PBPs - *penicillin-binding proteins*) (MIMS et al. 1999; MURRAY et al., 2005; TORTORA et al., 2012).

O peptidoglicano, por ser um componente vital da parede celular bacteriana e um composto característico das bactérias, torna-se um alvo ótimo para toxicidade seletiva. A síntese dos precursores do peptidoglicano inicia-se no citoplasma; as subunidades da parede são transportadas através da membrana citoplasmática e finalmente inseridas na molécula de peptidoglicano em formação, consequentemente várias etapas diferentes são alvos em potencial para inibição (MIMS et al. 1999).

As PBPs estão presentes na membrana citoplasmática sendo alvos dos antibióticos β -lactâmicos (MURRAY et al., 2005). Os β -lactâmicos inibem irreversivelmente a enzima transpeptidase que catalisa a reação de transpeptidação entre as cadeias de peptidoglicanos da parede celular bacteriana (GUIMARÃES et al., 2010). A inibição de uma ou mais destas enzimas essenciais resulta em acúmulo das unidades precursoras da parede celular que por sua vez induz a ativação do sistema autolítico da célula resultando na citólise (MIMS et al., 1999). Quando a bactéria é exposta ao antibiótico, este liga-se às PBPs na membrana celular bacteriana e às enzimas autolíticas são liberadas degradando a parede celular, ocorrendo a morte bacteriana.

A penetração dos antibióticos β -lactâmicos na célula bacteriana está diretamente relacionada com a estrutura de sua parede celular. Nas bactérias gram-positivas o peptidoglicano é o principal constituinte da parede celular, surgindo como um heteropolímero de composição complexa que confere resistência mecânica à parede (MURRAY et al., 2005; NORMARK; NORMARK, 2002). Neste

caso, a membrana citoplasmática encontra-se justaposta à parede estando inserido nesta estrutura, no folheto externo, o alvo dos antibióticos β -lactâmicos – as PBPs. Nas bactérias Gram-negativas, por sua vez, a parede celular apresenta-se mais estratificada, sendo constituída por camadas de lipopolissacarídeos e fosfolipídios, onde se inserem poros constituídos por proteínas (as porinas) sob as quais encontra-se a camada de peptidoglicano. Entre esta camada e a membrana citoplasmática confina-se o espaço periplasmático (NORMARK; NORMARK, 2002).

A estrutura rígida da parede celular permite que as bactérias mantenham uma pressão osmótica muito elevada, devido à ligação cruzada dos seus precursores, que ocorre durante a síntese da parede celular bacteriana, catalisada por enzimas específicas. Este processo é controlado pelas PBPs (LEMAIRE et al., 2008).

2.4 Antibióticos aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos foram descobertos em 1943, quando Waksman e colaboradores examinavam actinomicetos do solo e isolaram o *Streptomyces griseus* que elaborava uma potente substância antimicrobiana, a estreptomicina (GOODMAN e GILMAN et al., 2006). Os aminoglicosídeos formam um grupo de antibióticos em que os aminoaçúcares se encontram ligados por ligações glicosídicas, ou seja, possuem um grupo amino básico e uma unidade de açúcar (TORTORA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2010). Apresentam uma ação melhor em pH levemente alcalino, em torno de 7,4, onde estão positivamente carregados, facilitando a penetração em bactérias gram-negativas (GUIMARÃES, 2010). Eles estão entre os primeiros antibióticos a apresentar atividade significativa contra bactérias gram-negativas (TORTORA et al., 2012) e apresentam efeito sinérgico com β -lactâmicos (GUIMARÃES et al., 2010). Diferentemente da maioria dos inibidores de síntese protéica microbiana, que são bacteriostáticos, os aminoglicosídeos são bactericidas (GOODMAN e GILMAN et al., 2006; PUCCI; BUSH, 2013).

Os aminoglicosídeos podem afetar a audição ao causar danos permanentes ao nervo auditivo, além de danos renais também terem sido relatados. Embora sejam fármacos importante e amplamente utilizados, a grave toxicidade é o que limita a sua utilização (TORTORA et al., 2012; GOODMAN e GILMAN et al., 2006; PUCCI, BUSH, 2013). A ocorrência de mutações que afetam as proteínas

ribossomais bacterianas pode conferir acentuada resistência à sua ação. Frequentemente essa resistência pode resultar da aquisição de plasmídeos ou de genes presentes em transposons, adquiridos primariamente por conjugação e transferência de DNA, que codificam enzimas capazes de metabolizarem aminoglicosídeos, ou de um defeito no transporte do fármaco para o interior da célula bacteriana, reduzindo a eficácia clínica dos aminoglicosídeos (GOODMAN e GILMAN et al., 2006).

Antibióticos aminoglicosídicos, como a estreptomicina, a gentamicina e amikacina apresentam efeito bactericida por ligarem-se especificamente à subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, impedindo o movimento do ribossomo ao longo do mRNA e, conseqüentemente, interrompendo a síntese de proteínas. Dessa forma, eles atuam interferindo nas etapas iniciais da síntese proteica pela alteração conformacional da porção 30S do ribossomo 70S procariótico. Essa interferência leva à leitura incorreta do código genético impresso no mRNA (TORTORA et al., 2012; QUIMARÃES et al., 2010).

2.5 β -lactamases

As β -lactamases são enzimas com atividade hidrolítica, capazes de inativar uma grande variedade de antibióticos β -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas e os monobactâmicos (JAIN et al., 2003). Essas enzimas degradam o anel β -lactâmico dos antibióticos inativando-os (TRABULSI, 2008). Anteriormente ao uso da penicilina generalizado para o tratamento de infecções bacterianas, Abraham e Chain (1940) descreveram a primeira β -lactamase (BUSH, 1989). Desde então, inúmeras β -lactamases foram identificadas e vários esquemas de classificação foram propostos para agrupar estas enzimas de acordo com suas características bioquímicas e pela análise de suas estruturas moleculares (BUSH, KAREN, 1989, 2010; LIVERMORE, 1995). As β -lactamases foram divididas de acordo com suas estruturas primárias em quatro classes (A a D). De acordo com as diferenças em seus mecanismos catalíticos, as diferentes classes podem ser classificadas dentro de dois grupos: serina- β -lactamases (classes A, C e D) e metalo- β -lactamases (classe B) (BUSH et al., 1995; ROSSOLINI et al., 2001; BERTONCHELI; HÖRNER, 2008; BUSH, 2010).

A produção de β -lactamases é o mecanismo mais comum de resistência aos antibióticos β -lactâmicos e o mais representativo em bactérias Gram-negativas,

tendo apresentado, ao longo dos anos, um impacto considerável na eficácia daqueles antibióticos (LIVERMORE, 1995; WRIGHT, 2003).

No final da década de 1980, houve um aumento na incidência das bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL nas unidades de cuidados intensivos neonatais, especialmente em países em desenvolvimento. Este fato possivelmente está relacionado à maior utilização das cefalosporinas de terceira e quarta gerações, à necessidade frequente de procedimentos invasivos e à não adoção de medidas específicas de controle de infecção hospitalar (KIM et al., 2002; HERNÁNDEZ et al., 2003; BLOMBERG et al., 2005). As bactérias mais produtoras de β -lactamase relatadas na literatura são *K. pneumoniae* e a *Escherichia coli* (KIM et al., 2002; CASSETTARI et al., 2006).

2.5.1 Classificação das β -lactamases

Desde a década de 1960, vários esquemas de classificação funcional das β -lactamases evoluíram como apresentado por Bush, Jacoby e Medeiros em 1995, sendo a mais recente classificação das β -lactamases com base em quatro grupos (1-4) e subgrupos (A-F) (BUSH; JACOBY, 2010).

A classificação molecular das β -lactamases baseia-se em sequências de nucleotídeos dos aminoácidos destas enzimas. Até o momento, quatro classes são reconhecidas (A-D), correlacionando com a classificação funcional. As classes A, C, D agem por um mecanismo de base de serina, já a classe B ou metalo- β -lactamases precisa do zinco para sua ação (SAMAHA-KFOURY, 2003; BUSH, 2001; BUSH; JACOBY, 2010). Atualmente, tem sido utilizadas essas duas classificação conforme a tabela 1.

Tabela 1- Classificação das β -lactamases.

Classificação de Bush-Jacoby (2009) e Classe molecular	Substrato(s) diferente(s)	Inibida por CA ou TZB ¹ EDTA		Característica(s)	Enzima(s)
1C	Cefalosporinas	-	-	Hidrolisa mais cefalosporinas do que benzilpenicilinas, hidrolisa cefamicinas.	<i>E.coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1eC	Cefalosporinas	-	-	Hidrólise aumentada da ceftazidima e frequentemente de outros oximino- β -lactâmicos	GC1, CMY-37
2aA	Penicilinas	Sim	-	Hidrólise maior da benzilpenicilina do que das cefalosporinas	PC1
2bA	Penicilinas, primeiras cefalosporinas	Sim	-	Hidrólise semelhante de benzilpenicilina e cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2beA	Cefalosporinas e monobactâmicos de amplo espectro	Sim	-	Hidrólise aumentada de oximino- β -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2brA	Penicilinas	-	-	A resistência ao ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-30, SHV-10
2berA	Cefalosporinas e monobactâmicos de amplo espectro	-	-	Hidrólise aumentada de oxi-imino- β -lactâmicos, combinadas com a resistência a ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-50
2cA	Carbenicilina	Sim	-	Hidrólise aumentada de carbenicilina	PSE-1, CARB-3

(continua)

Tabela 1- Classificação das β -lactamases.

(continuação)

Classificação de Bush-Jacoby (2009) e Classe molecular	Substrato(s) diferente(s)	Inibida por		Característica(s)	Enzima(s)
		CAZ ou TZB ¹	EDTA		
2ceA	Carbenicilina, cefepime	Sim	-	Hidrólise aumentada de carbenicilina, cefepima e cefpiroma	RTG-4
2deD	Cefalosporinas de amplo espectro	V ²	-	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e oximino- β -lactâmicos	OXA-11, OXA-15
2dfD	Carbapenêmicos	V ²	-	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e carbapenêmicos	OXA-23, OXA-48
2eA	Cefalosporinas de amplo espectro	Sim	-	Hidrolisa cefalosporinas, é inibida pelo ácido clavulânico mas não pelo aztreonam	CepA
2fA	Carbapenêmicos	V	-	Hidrólise aumentada de carbapenêmicos, oximino- β -lactâmicos, cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a B (B1) B (B3)	Carbapenêmicos	-	Sim	Amplo espectro hidrolítico incluindo carbapenêmicos mas não os monobactâmicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3bB (B2) 4 ND ³	Carbapenêmicos	-	Sim	Hidrólise preferencial de carbapenêmicos	CphA, Sfh-1

Nota: ¹AC, ácido clavulânico, TZB, tazobactam²V, variável³ND, não determinado

Fonte: (BUSH; JACOBY, 2010)

As enzimas são agrupadas de acordo com sua atividade enzimática, o Grupo 1 é composto pelas cefalosporinases que são mais ativas contra cefalosporinas do que contra as benzilpenicilinas e são geralmente resistentes à inibição pelo ácido

clavulânico e ativas diante de cefamicinas, tais como cefoxitina. Essas enzimas do grupo 1 pertencentes à classe molecular C são codificadas por cromossomos de muitas Enterobacteriaceae e outros poucos micro-organismos. Em muitos micro-organismos, incluindo *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* e *P. aeruginosa*, a expressão da β -lactamase AmpC é baixa, mas a exposição a certos β -lactâmicos, tais como a amoxicilina, ampicilina, imipenem, e ácido clavulânico podem induzir à expressão do AmpC e assim à resistência (BUSH, 2010).

O Grupo 2 é representado pelas penicilinases e cefalosporinas que são inibidas pelo ácido clavulânico, correspondendo à classe molecular A e D (β -lactamases clássicas TEM e SHV). No entanto, devido ao crescente número de enzimas derivadas de β -lactamases TEM e SHV, estas foram divididas em duas sub-classes, 2a e 2b. O subgrupo 2a contém apenas penicilinases, enquanto 2b são β -lactamases de amplo espectro, o que significa que são capazes de inativar penicilinas e cefalosporinas na mesma proporção. Além disso, novos subgrupos foram determinados no subgrupo 2b: subgrupo 2be, possuindo longo espectro de atividade, representando as ESBLs, que são capazes de inativar cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima, cefotaxima, e cefpodoxime), bem como o monobactâmico aztreonam. Posteriormente, o subgrupo 2c foi segregado do grupo 2, porque estas enzimas inativam mais a carbenicilina do que a benzilpenicilina, com efeito sobre cloxacilina. O subgrupo 2d inativa mais a cloxacilina do que a benzilpenicilina, com atividade contra a carbenicilina. Estas enzimas são pouco inibidas pelo ácido clavulânico, e algumas delas são ESBLs. O subgrupo 2e corresponde às cefalosporinas que também podem hidrolisar monobactâmicos, sendo inibidas pelo ácido clavulânico. O subgrupo 2f foi adicionado porque corresponde as carbapenemases com base de serina, em contraste com a carbapenemase com base de zinco incluídos no grupo 3 (SAMAHA-KFOURY, 2003; BUSH, 2010).

A enzima TEM-1, da qual derivam as β -lactamases tipo TEM (de Temoniera, paciente), é a β -lactamase mais frequentemente detectada em bactérias Gram-negativas. Esta enzima foi a primeira β -lactamase mediada por plasmídeos a ser descrita neste grupo bacteriano. Atualmente, pode ser encontrada em várias espécies da família Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* e *N. gonorrhoeae*. Estima-se que 90% da resistência a ampicilina em *E. coli* seja devido à

produção da β -lactamase TEM (LIVERMORE, 1995). A β -lactamase TEM-3 foi a primeira ESBL descrita nesta família (BRADFORD, 2001).

As propriedades catalíticas das enzimas TEM variam de acordo com as substituições aminoacídicas que afetam diretamente o sítio ativo e, portanto, resultam das alterações nucleotídicas que ocorrem em posições específicas do gene *bla*_{TEM} que as codifica. Algumas destas alterações aminoacídicas resultam em variações no perfil de hidrólise, permitindo a capacidade de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração, no caso das ESBLs (BUSH, 1997; BRADFORD, 2001).

Atualmente, a maioria das enzimas tipo SHV são ESBLs, sendo, sobretudo produzidas por isolados de *K. pneumoniae*, sendo responsáveis por até 20% da resistência plasmidial à ampicilina. Além disso, em muitas cepas esse gene de resistência é integrado ao cromossomo bacteriano (BRADFORD, 2001).

Comparando as sequências da família de ESBL, a SHV revela que as mudanças de aminoácidos que dão origem ao fenótipo de resistência estendido estão restritas, relativamente, à poucas regiões da enzima (BRADFORD, 2001). Com base nas caracterizações das várias β -lactamases, o sistema de classificação elaborado por Bush, Jacoby e Medeiros (1995), atribui a maior parte das ESBLs ao grupo 2be, ou seja, β -lactamases que são inibidas pelo ácido clavulânico e que podem hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos (BUSH et al., 1995). Embora a susceptibilidade à inibidores de β -lactamases seja uma propriedade definidora de ESBLs, há vários exemplos de enzimas derivadas de TEM e SHV que têm um espectro de resistência semelhante à de ESBLs, mas são resistentes aos inibidores (BRADFORD, 2001).

As enzimas CTX-M (Cefotaximases), apresentaram uma disseminação bastante significativa nos últimos anos (BONNET, 2004). Vários autores sugerem que este grupo surgiu a partir de transferência genética horizontal e subsequente mutação do gene cromossômico *AmpC* (Ampicilinase de classe C) de *Kluyvera ascorbata*. Foi a existência de 99% de homologia entre os genes *AmpC* e *bla*_{CTX-M} que denunciou a origem do último (HUMENIUK et al., 2002). As ESBLs CTX-M têm sido detectadas por todo o mundo e frequentemente associadas a surtos na Europa, América do Sul e Japão (BRADFORD, 2001). O cenário epidemiológico das ESBLs CTX-M compreende o aparecimento de novas enzimas, a existência de múltiplos clones associados a surtos e a introdução frequente de vários elementos genéticos

envolvidos na disseminação do gene *bla*_{CTX-M}. A disseminação destas enzimas tem ocorrido de forma que não poderia ser apenas consequência de pressão seletiva devido ao uso de cefalosporinas de terceira geração. A evolução desta família de enzimas foi influenciada, a nível molecular, por eventos de recombinação de *bla*_{CTX-M} com sequências de inserção, transposons e pela transferência destes genes através de outros elementos genéticos móveis (BONNET, 2004; CANTÓN; COQUE, 2006).

Outras β -lactamases tem se destacado nos últimos anos: as carbapenemases. As do tipo OXA estão contidas em um novo subgrupo, o 2df, essas enzimas aparecem mais frequentemente em *A. baumannii* e geralmente são produzidas por genes localizados em cromossomos (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006; BUSH, KAREN; JACOBY, GEORGE, 2010), no entanto, enzimas transferidas por plasmídeos como a OXA-23 e OXA-48 já foram identificadas em Enterobacteriaceae (BUSH; JACOBY, 2010).

As serina-carbapenemases pertencem a classe A do subgrupo 2f. Essas enzimas são melhores inibidas pelo tazobactam do que pelo ácido clavulânico. Deste grupo uma das mais preocupantes é a KPC, já que são enzimas mediadas por plasmídeos e ativas contra carbapenêmicos. As carbapenemases KPC têm sido recentemente associadas com grandes surtos de infecções em hospitais causadas por bactérias Gram-negativas MDR. Essas enzimas foram relatadas nos EUA desde 1996, e recentemente tiveram uma expansão da sua distribuição geográfica, incluindo Israel, China, Europa, América Central e do Sul, e recentemente, o Brasil (PEIRANO et al., 2009; BUSH e JACOBY, 2010).

Na América do Sul, a primeira detecção de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 ocorreu na Colômbia em 2006 (BEIRÃO et al. 2010). O primeiro relato da KPC-2 no Brasil foi resultado de isolamentos entre setembro e novembro de 2006, nos quais foram detectadas 4 isolados produtores de KPCs de diferentes pacientes hospitalizados em unidades de cuidados intensivos em Recife-PE. Dois destes isolados eram provenientes de sangue do paciente e os outros dois da urina (MONTEIRO et al., 2009). Posteriormente foi detectado KPC-2 em 6 isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtores de ESBLs provenientes de 2 hospitais no Rio de Janeiro, de setembro de 2007 a maio de 2008 (PEIRANO et al., 2009). Em Recife, *bla*_{KPC} e outros genes de resistência também foram detectados em isolados de *K. pneumoniae* (CABRAL et al., 2012). Dentro da classe A, as β -lactamases do

tipo KPC são as mais freqüentes, principalmente entre as espécies da família Enterobacteriaceae; *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase tem se inserido recentemente aos patógenos nosocomiais MDR. Dez variantes do gene *bla*_{KPC} foram detectados: KPC-2 a 11 em Enterobacteriaceae, exceto para KPC-5, que foi descrito em um isolado de *P. aeruginosa*, e KPC-10, descrita em *A. baumannii*. β -lactamases do tipo KPC hidrolisam eficientemente penicilinas, cefalosporinas e o aztreonam além dos carbapenêmicos e são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam (PEIRANO et al. 2009; ROBLEDO et al., 2010; LASCOLS et al., 2012).

No Grupo 3 estão contidas as metalo- β -lactamases (MBLs), um único grupo de β -lactamases, tanto estruturalmente como funcionalmente, são geralmente produzidas em combinação com uma segunda ou terceira β -lactamase em isolados clínicos. Elas diferem estruturalmente das outras β -lactamases por sua exigência de um íon de zinco no sítio ativo (BUSH; JACOBY, 2010). São capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. Assim, os carbapenêmicos são inibidos por ambos os grupos 2f (mecanismo a base de serina) e 3 (mecanismo a base de zinco) (SAMAHA-KFOURY, 2003).

Em contraste com as serina- β -lactamases, as MBLs têm afinidade ou capacidade hidrolítica fraca para monobactâmicos e não são inibidas pelo ácido clavulânico ou tazobactam. Em vez disso, eles são inibidas por agentes quelantes de íons metálicos, tais como EDTA (BUSH; JACOBY, 2010). As MBLs são enzimas de classe B que incluem IMP, VIM, SPM, NDM cada uma com diferentes variantes. Essas enzimas conferem resistência aos carbapenêmicos e todos os β -lactâmicos, exceto o aztreonam e geralmente acompanha a resistência às quinolonas e aminoglicosídeos (SACHA et al., 2008). As enzimas IMP, VIM, SPM foram recentemente encontradas na família Enterobacteriaceae, mas são mais frequentemente detectadas em isolados de *P. aeruginosa* (GOOTZ, 2010; GUPTA, 2008; NICOLAU, OLIVER, 2008). Já a NDM foi primeiramente relatada em isolados de *K. pneumoniae*, mas já foi detectada em outras espécies (YONG et al., 2009; RASHEED et al., 2013)

No Brasil, nos últimos anos, enzimas do tipo VIM e SPM foram detectadas em diferentes estudos também em isolados *P. aeruginosa* (WIRTH et al., 2009; FURTADO et al., 2011; POLOTTO et al., 2012; JÁCOME et al., 2012; CAMARGO et al., 2014) já a do tipo IMP foi encontrada somente em um estudo (SADER et al.,

2005). Na espécie *K. pneumoniae* também existem relatos das metalo- β -lactamases (LINCOPAN et al., 2006; PENTEADO et al., 2009).

O grupo 4 são penicilinas que não são inibidas pelo ácido clavulânico, e que ainda não têm uma classe molecular correspondente (SAMAHA-KFOURY; ARAJ, 2003).

2.5.1.1 β -lactamases de amplo espectro (ESBLs)

A exposição persistente de cepas bacterianas à inúmeros β -lactâmicos levou a uma dinâmica e contínua seleção de diferentes β -lactamases presentes em diversas espécies bacterianas, com expansão da sua atividade, mesmo contra a terceira e quarta geração de cefalosporinas, como a ceftazidima, cefotaxima, cefoperazona, cefepima e o monobactâmico aztreonam. Assim, estas novas β -lactamases foram chamadas de β -lactamases de amplo espectro (ESBL) (BUSH, 2001; SAMAHA-KFOURY; ARAJ, 2003). Os isolados clínicos produtores de ESBLs são frequentemente associados com surtos nosocomiais, essas enzimas são detectadas mais comumente em isolados de *K. pneumoniae*, além de outros membros da família Enterobacteriaceae (RASHEED et al., 2000).

As primeiras ESBLs foram primeiramente isoladas de *K. pneumoniae* em 1983 na Alemanha (SHV-2), logo após a introdução de oximinocefalosporinas como a ceftazidima, cefoperazona, cefotaxima e o monobactâmico aztreonam. No ano seguinte, na França foi isolado a ESBL TEM-3, seguida de inúmeras variantes identificadas em muitas espécies da família Enterobacteriaceae no mundo todo. Essas enzimas hidrolisam oximino- β -lactâmicos tais como cefalosporinas de 3ª geração, sendo geralmente enzimas da classe A do grupo 2be, sendo altamente suscetíveis aos inibidores de β -lactamases (ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam) (SALADIN et al., 2002). As espécies produtoras de ESBLs apresentam um fenótipo de resistência com MICs elevados para cefalosporinas de 1ª e 2ª geração, assim como para as oximino-cefalosporinas de 3ª geração e ao monobactâmico aztreonam (GOOTZ, 2010).

As ESBLs são enzimas bacterianas mediadas por plasmídeos, sendo capazes de hidrolisar uma grande variedade de penicilinas e cefalosporinas. A maioria das ESBLs evoluíram por mutação genética de β -lactamases clássicas, principalmente TEM-1, TEM-2 e SHV-1, resultantes da substituição de 1 ou vários

aminoácidos (SALADIN et al., 2002), porém nem todas as variantes derivadas dessas enzimas apresentam uma ampliação do espectro hidrolítico, ou seja nem toda mutação irá representar uma nova ESBL (BRADFORD, 2001; JONES et al., 2009).

As β -lactamases clássicas são comumente encontrados em bactérias Gram-negativas, principalmente enterobactérias (BRADFORD, 2001), sendo altamente ativas contra as penicilinas e modestamente ativa contra cefalosporinas de primeira geração (BUSH et al., 1995). A enzima TEM-1 é geralmente codificada por plasmídeos, estando presente em vários membros da família Enterobacteriaceae (*K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp.) e espalhou-se para outras bactérias patogênicas Gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, e *Neisseria gonorrhoeae* (JONES et al., 2009). Em geral, as mutações que dão origem a ESBLs tendem a ser agrupadas em focos discretos dentro da sequência de nucleotídeos. Há pelo menos quatro “hot posts” na sequência de codificação de TEM-1, onde substituições em aminoácidos específicos, ou em um descendente de TEM-1, pode contribuir para o fenótipo ESBL (BRADFORD, 2001). As substituições nos resíduos 104 (glutamato por lisina), 164 (arginina por serina ou histidina), 238 (glicina por serina), e 240 (glutamato por lisina) parecem ser particularmente importantes na modificação do espectro de atividade da enzima. Estes resíduos estão localizados no local ou em torno do local de ligação aos β -lactâmicos, e essas substituições resultam em uma remodelação do sítio ativo, o que permite a ligação às cefalosporinas. Já foram relatadas pelo menos 178 enzimas do tipo TEM, mas nem todas têm um espectro de atividade ampliado (JONES et al., 2009; GOOTZ, 2010).

As ESBLs do tipo SHV evoluíram a partir da enzima SHV-1, em *K. pneumoniae*, sendo encontradas tanto em cromossomos como em plasmídeos em *Citrobacter* spp., *Escherichia coli* e de *P. aeruginosa*, dentre outros. As ESBLs derivadas de SHV-1 são um conjunto de enzimas menos diversificadas do que as enzimas da família TEM, onde a maioria das ESBLs que derivam da SHV-1 realizam uma substituição de serina pela glicina na posição 238. Além disso, substituições nos resíduos 156 (glicina pelo ácido aspártico) e 179 (ácido aspártico por glicina, asparagina, ou alanina) podem conduzir ao fenótipo ESBL, sendo a substituição no resíduo 238 muitas vezes combinada com uma segunda mutação na posição 240 (ácido glutâmico por lisina). Mais de 100 variantes da SHV-1 têm sido relatadas, no

entanto, nem todas as enzimas derivadas de SHV descritas são ESBLs (JONES et al., 2009).

Desde 2001 na Europa, o grupo CTX-M frequentemente tem sido detectado conferindo a bactéria um fenótipo característico para ESBL (GOOTZ, 2010). As ESBLs CTX-M são divididas em 5 grupos baseadas nas propriedades de suas sequências proteicas: (1) tipo CTX-M-2 com CTX-M-2, -M-4, -M-5, -M-6, -M-7 e Toho-1; (2) tipo CTX-M-1 com CTX-M-1, -M-3, -M-10, -M-12, -M-15; (3) com CTX-M-9, -M-14, -M-16, -M-18, -M-19 e Toho-2; (4) com CTX-M-8 e (5) com CTX-M-25 (SALADIN et al., 2002; LIVERMORE et al., 2007). As enzimas do grupo CTX-M, CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9 são as ESBLs mais frequentemente detectadas em isolados da família Enterobacteriaceae no Brasil e na América do Sul (PEIRANO et al., 2009; LOPES et al., 2010). Em Recife, Lopes et al. (2010) encontraram CTXM-2 em seis isolados e detectaram pela primeira vez a enzima CTX-M-28 na América do Sul; Cabral et al. (2012) detectaram CTX-M-2 em todos os isolados possuidores de CTX-M.

São inúmeros os relatos sobre a detecção de ESBLs em isolados clínicos. Oliveira et al. (2009) encontraram uma prevalência das ESBLs (TEM, CTX-M e SHV) de 96,9% em isolados de *K. pneumoniae*, sendo 89,1% e 79,7% do gene TEM e SHV respectivamente. Dropa et al. (2009) analisaram 127 isolados de cinco espécies diferentes, onde a prevalência encontrada de ESBLs foi CTX-M (33,9%), SHV (63%) e TEM (17,3%). Neste mesmo estudo 75,6 % (96) dos isolados de *K. pneumoniae* eram produtores de ESBLs sendo responsáveis por 74% (71) das enzimas SHV detectadas. Damjanova et al. (2007) encontraram β -lactamases do tipo SHV em todos os 126 isolados de *K. pneumoniae* estudados, já o tipo TEM foi encontrado em 34% dos isolados. Lal et al. (2007) verificaram que de 204 isolados de *K. pneumoniae* 170 eram produtores de ESBLs, onde 67,3% apresentavam SHV e TEM simultaneamente, sendo 20% (19) somente o gene TEM e 8,4% o SHV.

A resistência bacteriana representa um obstáculo para o tratamento de pacientes em um hospital, essa resistência se deve a presença de β -lactamases e da capacidade das bactérias formarem biofilme, além da resistência, as bactérias podem apresentar mecanismos de virulência que dificultam a melhora clínica de pacientes. Os antibióticos podem ser eficazes nas bactérias em forma plânctonica, no entanto, quando essas bactérias formam biofilme a ação pode ser reduzida.

3. HIPÓTESE

Os antibióticos β -lactâmicos cefotaxima e ceftazidima e ao aminoglicosídeo amicacina e a combinação da ceftazidima com amicacina em concentrações clinicamente relevantes interferem na capacidade de formação de biofilme por isolados de *K. pneumoniae* MDR portadores de diferentes β -lactamases e genes de virulência.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Determinar a presença de diferentes genes de resistência e virulência em isolados de *K. pneumoniae* MDR e determinar a capacidade desses isolados formarem biofilme quando submetidos ou não a cefotaxima, ceftazidima, amicacina e amicacina associada com ceftazidima.

4.2 Específicos

- Determinar a relação clonal dos isolados de *K. pneumoniae* MDR;
- Verificar a presença dos genes de resistência (*bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}) e de virulência (*cps*, *fimH* e *mrkD*) nos isolados de *K. pneumoniae* MDR produtores ou não de biofilme;
- Determinar a capacidade de formação de biofilme pelos isolados de *K. pneumoniae* MDR.
- Determinar a ação da ceftazidima, cefotaxima, amicacina e amicacina associada com ceftazidima na formação de biofilme nos isolados de *K. pneumoniae* MDR analisados.

5. METODOLOGIA

5.1 Isolados bacterianos

Foram analisados nove isolados de *K. pneumoniae* oriundos de pacientes internados em dois hospitais públicos da cidade de Recife-PE, obtidos nos anos de 2011 e 2012. Os isolados bacterianos estavam conservados em estoque congelado a -20°C e para serem analisados foram reativados em caldo BHI, incubados por 24 horas a 37°C e posteriormente semeados em ágar nas mesmas condições de incubação. A identificação bioquímica e o perfil de susceptibilidade de todos os isolados foi realizado em sistema automatizado VITEK® 2 (BioMérieux).

5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O teste de macrodiluição em caldo Mueller-Hinton foi realizado frente os antibióticos cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) e amicacina (AMC) utilizando as cepas de referência ATCC 700603 de *K. pneumoniae* e ATCC 25922 de *Escherichia coli*, como controle de qualidade, segundo recomendações do CLSI, 2013. Todos os isolados bacterianos foram incubados por 18 horas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 37 °C. O inóculo foi comparado e ajustado à escala 0,5 de MacFarland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Os isolados bacterianos foram inoculados em caldo Mueller-Hinton contendo as concentrações de 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 µg/ml de cada antibiótico e incubados para crescimento por 18 horas em estufa a 37 °C. Os critérios interpretativos utilizados foram os propostos pelo CLSI (2013).

5.3 Extração de DNA

A extração de DNA total foi realizada utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA purification Kit* (Promega), segundo instruções do fabricante. As amostras bacterianas foram crescidas em caldo BHI por 24 horas a 37°C e 1 ml da cultura foi utilizado para realização da extração. O DNA total extraído foi reidratado com 50 µl de solução de reidratação de DNA para armazenamento a -20°C. A quantificação do DNA extraído dos isolados de *K. pneumoniae* foi realizada em equipamento Nanodrop (Thermo Scientific).

5.4 ERIC-PCR

Para tipagem molecular foi empregado o método da ERIC-PCR utilizando os primers: ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (DUAN et al., 2009). As reações foram preparadas com volume final de 25 µl contendo 2,5 mM MgCl₂, 50 µM de cada dNTP, 0,3 µM de cada primer, 5 µl da amostra de DNA a 100 ng/ µl e 1,5U Taq DNA polymerase (Promega). As amplificações foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 92 °C para desnaturação, 1 minuto à 36°C para anelamento e 8 minutos à 72°C para extensão (CABRAL et al., 2012). Os amplicons foram corados com Blue green (LGC Biotechnology) e submetidos a corrida em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE por 80 minutos, sob as seguintes condições 100V, 190 mA, 150W. Os produtos de amplificação foram visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador e fotodocumentados para posterior análise, através da construção de um dendrograma utilizando o software PAST.

5.5 Identificação de genes que codificam β-lactamases

A detecção dos genes de resistência *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC} foi realizada em todos os isolados de *K. pneumoniae*. Para amplificação dos genes foram utilizados os seguintes primers: *bla*_{TEM}: T1: 5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA-3' e T2: 5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC-3' (RASHEED et al., 2000); *bla*_{SHV}: SHV.FoR: 5'-GGTTATGCGTTATATTCGCC-3', SHV.ReR: 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3' (RASHEED et al., 2000); *bla*_{CTX-M}: MA1: 5'-SCSATGTGCAGYACCAGTAA-3', MA2: 5'-CCGCRATATGRTTGGTGGTG-3' (SALADIN et al., 2002); *bla*_{KPC}: KPC-1a: 5'-TGTCAGTGTATCGCCGTC-3', KPC-1b: 5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC-3' (YIGIT et al., 2001). As reações de amplificação foram realizadas utilizando um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1 µl de DNA genômico a 20 ng/µl, 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Promega), 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (GeHealthcare), 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmol dos primers, além de 2,5 µl de tampão (10x). As amplificações foram realizadas em termociclador (Genepro, Bioer), utilizando a

seguinte ciclagem: 5 minutos a 96°C para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos, consistindo cada de 1 minuto a 96°C para desnaturação, 1 minuto para anelamento dos primers utilizando as temperaturas de 57°C para o gene *bla*_{TEM}, 67°C para *bla*_{SHV}, 68°C para *bla*_{KPC}, 62°C para *bla*_{CTX-M}, seguido de 1 minuto a 72°C para extensão. Após os 35 ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72°C.

5.6 Amplificação da região promotora para produção de cápsula polissacarídica

A determinação da presença de região promotora gênica por PCR em todos os isolados de *K. pneumoniae* foi realizada utilizando os parâmetros e primers para anelamento em região conservada entre os diferentes sorotipos capsulares, descritos previamente por Hennequin e Forestier (2007), o CPSp: 5'-TCCCAATTGTGACCGAAATC-3' e o CPSprev: 5'-GCTCGCGGCACCAGCTGA-3'. As reações de amplificação foram realizadas nas mesmas condições descritas anteriormente, com temperatura de anelamento de 63°C.

5.7 Detecção dos genes fimbriais *fimH* e *mrkD*

Todos os isolados de *K. pneumoniae* foram analisados por PCR quanto a presença do gene *fimH*, codificante de fimbria tipo 1, utilizando os primers: forward 5'-CACGCAAGGCACCATTC-3' e reverse 5'-GCTCAGAATCAACATCGGTAAC-3' (STAHLHUT et al., 2009). Também foi pesquisado o gene *mrkD*, codificante da adesina fimbrial tipo 3, utilizando os primers *mrkD* 2 F: 5'-CCACCAACTATTCCCTCGAA-3' e *mrkD* 2 R: 5'-ATGGAACCCACATCGACATT-3' (HENNEQUIN; FORESTIER, 2007). As reações de amplificação foram realizadas conforme descrito anteriormente, com temperaturas de anelamento de 58°C para *fimH* e a 59°C para *mrkD*.

5.8 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE a temperatura ambiente, por quarenta minutos, a 100V e 50mA utilizando o tampão BlueGreen Loading Dye (LGC Biotecnologia). Após o término da migração o DNA foi observado em luz UV em transluminador, para determinar o tamanho em pb do produto da PCR por comparação com o marcador de peso molecular de 100 pb utilizado. Os géis foram registrados no sistema de fotodocumentação Loccus Biotecnologia do setor de Biologia Molecular do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE).

5.9 Formação de biofilme

A avaliação da formação de biofilme foi realizada em todos os 9 isolados de *K. pneumoniae* conforme metodologia descrita por Pour et al. (2011) com modificações. Para a determinação da capacidade dos isolados formarem biofilme em caldo BHI e Mueller Hinton separadamente sem a presença de antibióticos (controle), um ml de cultura com crescimento bacteriano de cada isolado foi transferido para erlenmeyers contendo um pedaço de catéter de aproximadamente 1 cm e 50 ml de meio, para incubação a 37°C por 72 horas sob duas condições: sem agitação e sob rotação de 200 rpm.

Todos os isolados (K483, K652, K952, K786, K330, K3294, K38727, K39915, K1) foram analisados quanto a capacidade de formarem biofilme na superfície de catéteres quando submetidos a ceftazidima e cefotaxima separadamente, um ml do crescimento bacteriano de cada isolado, contendo $1,5 \times 10^8$ células, foi transferido para erlenmeyers contendo os antibióticos, um pedaço de catéter de aproximadamente 1 cm e 50 ml de caldo Mueller Hinton. Outro ensaio foi realizado com os isolados K1, K652 e K483 que foram resistentes a amicacina, os quais também foram submetidos a este antibiótico sozinho e em combinação com a ceftazidima. As concentrações utilizadas dos antibióticos foram escolhidas para simular as concentrações clinicamente relevantes de ceftazidima (27 µg/ml), cefotaxima (102 µg/ml) e amicacina (4 µg/ml) (ADAMIS et al., 2004; AHSMAN et al., 2010; HIRSCH et al., 2012). Os isolados foram incubados a 37°C por 72 horas sob rotação de 200 rpm e em seguida foram analisados pelo MEV.

5.10 Microscopia de Varredura (MEV)

A análise da formação de biofilme nos isolados de *K. pneumoniae* sob diferentes condições foi realizado pela MEV. Após o crescimento bacteriano os cateteres foram lavados em tampão fosfato 0,1M, pH, 7,4 para posterior fixação em tampão fosfato 0,1M e glutaraldeído a 2,5%. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M por 90 minutos. Em seguida foram realizadas três lavagens em tampão fosfato 0,1M para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de etanol a 30%, 50%, 70%, 90% e 3 vezes de 100% por 10 minutos cada etapa. Após a desidratação foi realizado o ponto crítico para a substituição do etanol por dióxido de carbono, obtendo-se a secagem do material para montagem do material em *stubs* metálicos utilizando uma fita dupla face de carbono. Em seguida, foi realizada a metalização cobrindo o material por uma fina camada de ouro, para visualização da formação do biofilme no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5600 LV.

6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo não necessitou ser submetido a análise pelo Comitê de Ética em pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS/UFPE. Devido os isolados bacterianos utilizados neste projeto terem sido obtidos pelos laboratórios dos hospitais e foram cedidos sem dados do paciente.

7. RESULTADOS

Os resultados da pesquisa encontram-se apresentados em forma de artigo, os quais estão dispostos nos Apêndices A e B.

8. CONCLUSÕES

- Isolados de *K. pneumoniae* multidroga-resistentes portadores de diferentes β -lactamases como *blactx-m*, *blashv*, *blatem* e genes de virulência como *cps* *fimH* e *mrkD* podem formar biofilme, mesmo quando submetidos a sub-MICs dos antibióticos cefotaxima, ceftazidima e amicacina; no entanto, dois isolados com altas CIMs dos antibióticos cefotaxima e ceftazidima quando submetidos a esses antibióticos não formaram biofilme. Sendo assim, os antibióticos podem inibir ou favorecer a formação de biofilme, dependendo do isolado e do antibiótico o qual ele foi submetido.
- Todos os isolados foram capaz de formar biofilmes na ausência de antibióticos, além de apresentarem os genes de virulência *mrkD* e *cps* que estão associados com a formação de biofilmes;

REFERÊNCIAS

ADAMIS, G.; PAPAIOANNOU, M. G.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; et al. Pharmacokinetic interactions of ceftazidime, imipenem and aztreonam with amikacin in healthy volunteers. **International journal of antimicrobial agents**, v. 23, n. 2, p. 144–9, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15013039>>. Acesso em: 29/1/2013.

AHSMAN, M. J.; WILDSCHUT, E. D.; TIBBOEL, D.; MATHOT, R. A. Pharmacokinetics of cefotaxime and desacetylcefotaxime in infants during extracorporeal membrane oxygenation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 1734–41, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2863660&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8/1/2014.

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*. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 916–20, 1991. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=207091&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

ANBAZHAGAN, D.; MANSOR, M.; YAN, G. O. S.; et al. Detection of quorum sensing signal molecules and identification of an autoinducer synthase gene among biofilm forming clinical isolates of *Acinetobacter* spp. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e36696, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3398020&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3/11/2012.

ANDERL, J. N.; FRANKLIN, M. J.; STEWART, P. S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1818–24, 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=89967&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

ARAUJO, C. DE; BALESTRINO, D.; ROTH, L.; CHARBONNEL, N.; FORESTIER, C. Quorum sensing affects biofilm formation through lipopolysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. **Research in microbiology**, v. 161, n. 7, p. 595–603, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20600864>>. Acesso em: 3/11/2012.

BALESTRINO, D.; GHIGO, J.-M.; CHARBONNEL, N.; HAAGENSEN, J. A. J.; FORESTIER, C. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 3, p. 685–701, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18237304>>. Acesso em: 3/11/2012.

BARRETO S, ZAMBRANO M, A. M. [Phenotypic variations of susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* strains of nosocomial origin and their association with biofilm formation]. PubMed Commons. **Invest Clin**, v. 50, n. 2, p. 221–229, 2009.

BARUS, T.; HANJAYA, I.; SADELI, J.; et al. Genetic Diversity of *Klebsiella* spp. Isolated from Tempe based on Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR). **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 20, n. 4, p. 171–176, 2013. Disponível em: <<http://journal.ipb.ac.id/index.php/hayati/article/view/7320>>. Acesso em: 12/2/2014.

BEIRÃO, E. M.; FURTADO, J. J. D.; GIRARDELLO, R.; FERREIRA FILHO, H.; GALES, A. C. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 69–73. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21412593>>. .

BENGHEZAL, M.; ADAM, E.; LUCAS, A.; et al. Inhibitors of bacterial virulence identified in a surrogate host model. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1336–42, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17474906>>. Acesso em: 30/1/2014.

BERTONCHELI, C. D. M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 577–599, 2008.

BLOMBERG, B.; JUREEN, R.; MANJI, K. P.; et al. High Rate of Fatal Cases of Pediatric Septicemia Caused by Gram-Negative Bacteria with Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Dar es Salaam , Tanzania. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 43, n. 2, p. 745–749, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC548071/>>. .

BODDICKER, J. D.; ANDERSON, R. A; JAGNOW, J.; CLEGG, S. Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. **Infection and immunity**, v. 74, n. 8, p. 4590–7, 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1539622&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27/8/2013.

BONNET, R. Growing Group of Extended-Spectrum beta-Lactamases: the CTX-M Enzymes. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 48, n. 1, p. 1–14, 2004. Disponível em: <BONNET, R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. Antimicrobial agents and chemotherapy , v. 48, n. 1, 2004. Disponível em: <http://aac.asm.org/content/48/1/1.full>>. .

BRADFORD. 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89009/>>. .

BUSH, K. MINIREVIEWS Characterization of β -Lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 33, n. 3, p. 259–263, 1989. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/33/3/259.full.pdf>>. .

BUSH, K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 32, n. 7, p. 1085–9, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264037>>. .

BUSH, K. Bench-to-bedside review: The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. **Bush Critical Care**, v. 14, n. 224, p. 1–8, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2911681/>>. .

BUSH, K.; JACOBY, G. Nomenclature of TEM beta-lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 39, p. 1–3, 1997.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–76, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2825993&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 29/10/2012.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure . MINIREVIEW A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure Downloaded from <http://aac.asm.org/> on Novem. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995.

CABRAL, A. B.; CÁSSIA, R. DE; MELO, D. A.; AMÉLIA, M.; MACIEL, V. Major Article among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife , Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 572–578, 2012.

CAMARGO, C. H.; BRUDER-NASCIMENTO, A.; MONDELLI, L.; MONTELLI, A. C.; SADATSUNE, T. Brazilian Journal of Infectious Diseases Detection of SPM and IMP metallo- β -lactamases in clinical specimens of *Pseudomonas aeruginosa*. , p. 1–5, 2014.

CAMPOS, M. A.; VARGAS, M. A.; BALEARES, I.; MALLORCA, P. DE. Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides. , v. 72, n. 12, p. 7107–7114, 2004.

CANTÓN, R.; COQUE, T. M. The CTX-M beta-lactamase pandemic. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 5, p. 466–75, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16942899>>. Acesso em: 27/10/2012.

CASSETTARI, V. C.; SILVEIRA, I. R. DA; BALSAMO, A. C.; FRANCO, F. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit linked to onychomycosis in a healthcare worker.

Jornal de pediatria, v. 82, n. 4, p. 313–6, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16912835>>. Acesso em: 25/11/2012.

CHEN, F.-J.; CHAN, C.-H.; HUANG, Y.-J.; et al. Structural and mechanical properties of *Klebsiella pneumoniae* type 3 Fimbriae. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 7, p. 1718–25, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3067671&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/11/2012.

CHOUDHURY, D. X-ray Structure of the FimC-FimH Chaperone-Adhesin Complex from Uropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 285, n. 5430, p. 1061–1066, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.285.5430.1061>>. Acesso em: 2/11/2012.

CIRIONI, O.; GHISELLI, R.; SILVESTRI, C.; et al. Effect of the combination of clarithromycin and amikacin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in an animal model of ureteral stent infection. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 6, p. 1318–23, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21406436>>. Acesso em: 16/2/2014.

CONNELL, I.; AGACE, W.; KLEMM, P.; et al. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 18, p. 9827–32, 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38514&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

CORONA-IZQUIERDO, F. P.; MEMBRILLO-HERNÁNDEZ, J. Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(N-morpholino)propane sulfonate (MOPS). **Research in microbiology**, v. 153, n. 3, p. 181–5, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12002568>>. .

COSTERTON, J. W. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5418.1318>>. Acesso em: 5/11/2012.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; DEBEER, D.; CALDWELL, D.; KORBER, D. MINIREVIEW Biofilms , the Customized Microniche. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 8, p. 2137–2142, 1994.

DIAS, A.; OLIVEIRA, G.; OLIVEIRA, H.; MARQUES, M.; RODRIGUES, F. BACILOS GRAM NEGATIVOS PRODUTORES DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO EXPANDIDO Num Hospital Pediátrico. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, p. 197–206, 2011. Disponível em: <<http://www.actamedicaportuguesa.com/pdf/2011-24/suplemento-originais/197-206.pdf>>. .

DOMENICO, P.; SALO, R. J.; CROSS, A S.; CUNHA, B. A. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and**

immunity, v. 62, n. 10, p. 4495–9, 1994. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=303135&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–90, 2002. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2732559&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

DRANCOURT, M.; BOLLET, C.; CARTA, A; ROUSSELIER, P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. Pt 3, p. 925–32, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11411716>>. .

DROPA, M.; BALSALOBRE, L. C.; LINCOPAN, N.; et al. Extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae isolated in a public hospital in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 4, p. 203–209, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652009000400005&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 18/1/2013.

DUAN, H.; CHAI, T.; LIU, J.; et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental research**, v. 109, n. 5, p. 511–7, 2009. Elsevier. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19349045>>. Acesso em: 28/1/2013.

EVRARD, B.; BALESTRINO, D.; DOSGILBERT, A; et al. Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 78, n. 1, p. 210–9, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2798207&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23/11/2012.

FADER, R. C.; DAVIS, C. P. Effect of piliation on *Klebsiella pneumoniae* infection in rat bladders. **Infection and immunity**, v. 30, n. 2, p. 554–61, 1980. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=551347&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

FADER, R. C.; DUFFY, L. K.; DAVIS, P.; KUROSKYG, A. Purification and Chemical Characterization of Type 1 Pili Isolated. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 257, n. 6, p. 3301–3305, 1981.

FAVRE-BONTE, S.; JOLY, B.; FORESTIER, C. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 67, n. 2, p. 554–61, 1999. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=96354&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

FRANK, D. N.; WILSON, S. S.; ST AMAND, A. L.; PACE, N. R. Culture-independent microbiological analysis of foley urinary catheter biofilms. **PloS one**, v. 4, n. 11, p. e7811, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2771765&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/11/2012.

FREITAS, MACHADO, SOARES, B. A. EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASES IN KLEBSIELLA SPP AND ESCHERICHIA COLI OBTAINED IN A BRAZILIAN TEACHING HOSPITAL : DETECTION , PREVALENCE AND MOLECULAR TYPING. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 344–348, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822003000400012>. .

FUMAGALLI, O.; TALL, B. D.; SCHIPPER, C.; OELSCHLAEGER, T. A. N-glycosylated proteins are involved in efficient internalization of Klebsiella pneumoniae by cultured human epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 65, n. 11, p. 4445–51, 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=175639&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

FURTADO, G. H. C.; GALES, A. C.; PERDIZ, L. B.; SANTOS, A. F.; MEDEIROS, E. A. S. DE. Prevalence and clinical outcomes of episodes of ventilator-associated pneumonia caused by SPM-1-producing and non-producing imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 604–606, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822011000500015&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 12/2/2014.

GERLACH, G. F.; CLEGG, S.; ALLEN, B. L. Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of Klebsiella pneumoniae. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 3, p. 1262–70, 1989. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=209739&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

GOLLER, C. C.; SEED, P. C. Revisiting the. , , n. August, p. 333–337, 2010.

GOOTZ, T. D. The global problem of antibiotic resistance. **Critical reviews in immunology**, v. 30, n. 1, p. 79–93, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20370622>>. .

GOPAL, R.; KIM, Y. G.; LEE, J. H.; et al. Synergistic effects and anti-biofilm properties of chimeric peptides against MDR Acinetobacter baumannii strains. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, , n. December, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24366740>>. Acesso em: 17/1/2014.

GUIMARÃES, D. L. DA S. M. E M. T. P. ANTIBIÓTICOS: IMPORTÂNCIA TERAPÊUTICA E PERSPECTIVAS PARA A DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES. , v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422010000300035&script=sci_arttext>. .

GUPTA, A.; AMPOFO, K.; RUBENSTEIN, D.; SAIMAN, L. Extended spectrum beta lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a review of the literature. **Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association**, v. 23, n. 6, p. 439–43, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679928>>. Acesso em: 19/10/2012.

GUPTA, V. An update on newer beta-lactamases. **The Indian journal of medical research**, v. 126, n. 5, p. 417–27, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18160745>>. .

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95–108, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040259>>. Acesso em: 1/11/2012.

HANCOCK, V.; WITSØ, I. L.; KLEMM, P. Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 301, n. 7, p. 570–6, 2011. Elsevier GmbH. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646046>>. Acesso em: 19/10/2012.

HELD, T. K.; ADAMCZIK, C.; TRAUTMANN, M.; CROSS, A S. Effects of MICs and sub-MICs of antibiotics on production of capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 5, p. 1093–6, 1995. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=162689&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

HENNEQUIN, C.; AUMERAN, C.; ROBIN, F.; TRAORE, O.; FORESTIER, C. Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2123–30, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22577106>>. Acesso em: 27/10/2012.

HENNEQUIN, C.; FORESTIER, C. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. **Research in microbiology**, v. 158, n. 4, p. 339–47, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17446046>>. Acesso em: 25/10/2012.

HERNÁNDEZ, J.; PASCUAL, Á.; CANTÓN, R.; et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002). **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 21, n. 2, p. 77–82, 2003. Disponível em: <http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13042863&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=28&ty=9&accion=L&origen=elsevier&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=28v21n02a13042863pdf001.pdf>. .

HIRSCH EB, GUO B, CHANG KT, CAO H, LEDESMA KR, SINGH M, T. V. Assessment of antimicrobial combinations for *Klebsiella pneumoniae* PubMed Commons. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 5, p. 786–793, 2012.

HOCEVAR SN, EDWARDS JR, HORAN TC, MORRELL GC, IWAMOTO M, L. F. Device-associated infections among neonatal intensive care unit patients : incidence and associated pathogens reported to the National Healthcare Safety Network , 2006-2008 . **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 33, n. 12, p. 1200–1206, 2012.

HORNICK, D. B.; ALLEN, B. L.; HORN, M. A; CLEGG, S. Fimbrial types among respiratory isolates belonging to the family Enterobacteriaceae. **Journal of clinical microbiology**, v. 29, n. 9, p. 1795–800, 1991. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=270213&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

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. **Infection and immunity**, v. 60, n. 4, p. 1577–88, 1992. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=257033&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

HORNICK, D. B.; THOMMANDRU, J.; SMITS, W.; CLEGG, S. Adherence properties of an mrkD-negative mutant of Klebsiella pneumoniae. **Infection and immunity**, v. 63, n. 5, p. 2026–32, 1995. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=173260&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

HOUARI, A; MARTINO, P. DI. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. **Letters in applied microbiology**, v. 45, n. 6, p. 652–6, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17944843>>. Acesso em: 19/10/2012.

HUMENIUK, C.; ARLET, G.; GAUTIER, V.; et al. beta-Lactamases of Kluyvera ascorbata, Probable Progenitors of Some Plasmid-Encoded CTX-M Types. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 46, n. 9, p. 3045–3049, 2002.

JACOBSEN, A. L.; PRATT, R. B.; DAVIS, S. D.; EWERS, F. W. Comparative community physiology: nonconvergence in water relations among three semi-arid shrub communities. **The New phytologist**, v. 180, n. 1, p. 100–13, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18627498>>. Acesso em: 30/10/2012.

JÁCOME, P. R. L. D. A.; ALVES, L. R.; CABRAL, A. B.; LOPES, A. C. S.; MACIEL, M. A. V. First report of KPC-producing Pseudomonas aeruginosa in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4990, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3421877&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27/8/2013.

JAGNOW, J. Klebsiella pneumoniae MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. **Microbiology**, v. 149, n. 9, p. 2397–2405, 2003. Disponível em: <<http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.26434-0>>. Acesso em: 25/10/2012.

JOHNSON, J. G.; MURPHY, C. N.; SIPPY, J.; JOHNSON, T. J.; CLEGG, S. Type 3 fimbriae and biofilm formation are regulated by the transcriptional regulators MrkHI in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 14, p. 3453–60, 2011a. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3133326&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19/10/2012.

JOHNSON, J. G.; MURPHY, C. N.; SIPPY, J.; JOHNSON, T. J.; CLEGG, S. Type 3 fimbriae and biofilm formation are regulated by the transcriptional regulators MrkHI in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 14, p. 3453–60, 2011b. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3133326&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27/8/2013.

JONES, H.; RUZIN, A.; TUCKMAN, M.; et al. Pyrosequencing using the single-nucleotide polymorphism protocol for rapid determination of TEM- and SHV-type extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates and identification of the novel beta-lactamase genes blaSHV-48, blaSHV-105, and blaTEM-155. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 977–86, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2650538&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23/11/2012.

JONES, R. N. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 51 Suppl 1, p. S81–7, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20597676>>. Acesso em: 2/11/2012.

KAPLAN, J. B.; IZANO, E. A.; GOPAL, P.; et al. Low Levels of β -Lactam Antibiotics Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. **mBio**, v. 3, n. 4, p. 1–14, 2012.

KIM, Y.; PAI, H.; LEE, H.; et al. Bloodstream Infections by Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Children: Epidemiology and Clinical Outcome. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 46, n. 5, p. 1481–1491, 2002.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Fimbrial surface display systems in bacteria: from vaccines to random libraries. **Microbiology (Reading, England)**, v. 146 Pt 12, p. 3025–32, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11101660>>. .

KUCZYŃSKA-WIŚNIK, D.; MATUSZEWSKA, E.; FURMANEK-BLASZK, B.; et al. Antibiotics promoting oxidative stress inhibit formation of *Escherichia coli* biofilm via indole signalling. **Research in microbiology**, v. 161, n. 10, p. 847–53, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20868745>>. Acesso em: 19/10/2012.

LAL, P.; KAPIL, A.; DAS, B. K.; SOOD, S. Occurrence of TEM & SHV gene in extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella* sp. isolated from

a tertiary care hospital. **The Indian journal of medical research**, v. 125, n. 2, p. 173–8, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17431288>>. .

LANGSTRAAT, J.; BOHSE, M.; CLEGG, S. Type 3 Fimbrial Shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae* , but Not the Fimbrial Adhesin (MrkD), Facilitates Biofilm Formation. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 69, n. 9, p. 5805–5812, 2001.

LEE, H.-W.; KOH, Y. M.; KIM, J.; et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 49–54, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18005176>>. .

LEMAIRE, S.; FUDA, C.; BAMBEKE, F. VAN; TULKENS, P. M.; MOBASHERY, S. Restoration of susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to beta-lactam antibiotics by acidic pH: role of penicillin-binding protein PBP 2a. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 19, p. 12769–76, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2442357&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23/11/2012.

LI, X.; ZHANG, D.; CHEN, F.; et al. *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. Pt 6, p. 2131–6, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15545446>>. Acesso em: 18/1/2013.

LINCOPAN, N.; LEIS, R.; VIANELLO, M. A; et al. Enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Brazilian hospitals. **Journal of medical microbiology**, v. 55, n. Pt 11, p. 1611–3, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17030928>>. Acesso em: 21/11/2012.

LIU, Y.; WANG, J.-Y.; JIANG, W. An Increasing Prominent Disease of *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess: Etiology, Diagnosis, and Treatment. **Gastroenterology research and practice**, v. 2013, p. 258514, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3806164&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

LIVERMORE. Beta-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. , v. 8, n. 4, p. 557–584, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172876/pdf/080557.pdf>>. .

LIVERMORE, D. M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 557–84, 1995. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=172876&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

LLOBET, E.; TOMÁS, J. M.; BENGOCHEA, J. A. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. **Microbiology (Reading, England)**, v. 154, n. Pt 12, p. 3877–86, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19047754>>. Acesso em: 18/1/2013.

LOPES, A. C. S.; VERAS, D. L.; LIMA, A. M. S.; MELO, R. D. C. A.; AYALA, J. bla(CTX-M-2) and bla(CTX-M-28) extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 163–7, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20428675>>. .

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. **Infection and immunity**, v. 49, n. 3, p. 785–9, 1985. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=261276&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

MAGESH, H.; KUMAR, A.; ALAM, A.; et al. Identification of natural compounds which inhibit biofilm formation in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* . PubMed Commons. **Indian Journal of Experimental Biology (IJEB)**, v. 51, n. 9, p. 764–772, 2013.

MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34–9, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166241>>. .

MARCH, C.; CANO, V.; MORANTA, D.; et al. Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56847, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3574025&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30/1/2014.

MARTINEZ, J. J.; MULVEY, M. A; SCHILLING, J. D.; PINKNER, J. S.; HULTGREN, S. J. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. **The EMBO journal**, v. 19, n. 12, p. 2803–12, 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=203355&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

MARTINO, P. DI; SIROT, D.; JOLY, B.; RICH, C.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. Relationship between adhesion to intestinal Caco-2 cells and multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1499–503, 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=229774&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

MATATOV, R.; GOLDHAR, J.; SKUTELSKY, E.; et al. Inability of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* to assemble functional type 1 fimbriae on their surface. **FEMS microbiology letters**, v. 179, n. 1, p. 123–30, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10481096>>. .

MATSEN, J. M.; SPINDLER, J. A; BLOSSER, R. O. Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. **Applied microbiology**, v. 28, n. 4, p. 672–8, 1974. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=186795&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

MEACHAM, K. J.; ZHANG, L.; FOXMAN, B.; et al. Evaluation of Genotyping Large Numbers of Escherichia coli Isolates by Enterobacterial Repetitive Intergenic Evaluation of Genotyping Large Numbers of Escherichia coli Isolates by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR. ,2003.

MEDELL, M.; HART, M.; MARRERO, O.; et al. Clinical and microbiological characterization of pneumonia in mechanically ventilated patients. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 442–7, 2012. Elsevier Editora Ltda. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22975167>>. Acesso em: 18/1/2013.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F.; ASENSI, M. D.; PEIRANO, G.; GALES, A. C. First report of KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333–4, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2612176&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25/11/2012.

MOORE, R.; O'SHEA, D.; GEOGHEGAN, T.; MALLON, P. W. G.; SHEEHAN, G. Community-acquired Klebsiella pneumoniae liver abscess: an emerging infection in Ireland and Europe. **Infection**, v. 41, n. 3, p. 681–6, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23381876>>. Acesso em: 12/2/2014.

MORANTA, D.; REGUEIRO, V.; MARCH, C.; et al. Klebsiella pneumoniae capsule polysaccharide impedes the expression of beta-defensins by airway epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 78, n. 3, p. 1135–46, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2825953&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23/11/2012.

MORGAN, M. E.; HART, C. A.; COOKE, R. W. Klebsiella infection in a neonatal intensive care unit: role of bacteriological surveillance. **The Journal of hospital infection**, v. 5, n. 4, p. 377–85, 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6085092>>. .

MULVEY, M. A. Induction and Evasion of Host Defenses by Type 1-Piliated Uropathogenic Escherichia coli. **Science**, v. 282, n. 5393, p. 1494–1497, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.282.5393.1494>>. Acesso em: 31/10/2012.

NAPARSTEK, L.; CARMELI, Y.; NAVON-VENEZIA, S.; BANIN, E. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing Klebsiella pneumoniae. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1–8, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24408988>>. Acesso em: 30/1/2014.

NELSON, E. C.; SEGAL, H.; ELISHA, B. G. Outer membrane protein alterations and blaTEM-1 variants: their role in beta-lactam resistance in Klebsiella pneumoniae. **The**

Journal of antimicrobial chemotherapy, v. 52, n. 6, p. 899–903, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613957>>. Acesso em: 16/2/2014.

NIVEDITHA, S.; PRAMODHINI, S.; UMADEVI, S.; KUMAR, S.; STEPHEN, S. The Isolation and the Biofilm Formation of Uropathogens in the Patients with Catheter Associated Urinary Tract Infections (UTIs). **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 6, n. 9, p. 1478–82, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23285434>>. Acesso em: 30/1/2014.

NORMARK, B. H.; NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. **Journal of internal medicine**, v. 252, n. 2, p. 91–106, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12190884>>. .

OELSCHLAEGER, T. A; TALL, B. D. Invasion of cultured human epithelial cells by Klebsiella pneumoniae isolated from the urinary tract. **Infection and immunity**, v. 65, n. 7, p. 2950–8, 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=175413&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

OFEK, I.; HASTY, D. L.; SHARON, N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 181–191, 2003. Disponível em: <[http://doi.wiley.com/10.1016/S0928-8244\(03\)00228-1](http://doi.wiley.com/10.1016/S0928-8244(03)00228-1)>. Acesso em: 2/11/2012.

ONG, C.-L. Y.; ULETT, G. C.; MABBETT, A. N.; et al. Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic Escherichia coli reveals a role in biofilm formation. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 3, p. 1054–63, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2223576&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3/11/2012.

PAN, Y.-J.; FANG, H.-C.; YANG, H.-C.; et al. Capsular polysaccharide synthesis regions in Klebsiella pneumoniae serotype K57 and a new capsular serotype. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2231–40, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2446917&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30/1/2014.

PATERSON, D. L.; ROSSI, F.; BAQUERO, F.; et al. In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 965–73, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15849262>>. Acesso em: 2/11/2012.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; VAL PASSOS, V. L.; et al. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in Klebsiella pneumoniae isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 265–8, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19028717>>. Acesso em: 3/11/2012.

PENTEADO, A. P.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A. C. C.; et al. Dissemination of bla(IMP-1)-carrying integron In86 among *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring a new trimethoprim resistance gene dfr23. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 63, n. 1, p. 87–91, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18990526>>. Acesso em: 30/1/2014.

PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **International journal of medical microbiology: IJMM**, v. 300, n. 6, p. 371–9, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20537585>>. Acesso em: 27/10/2012.

PODSCHUN, R.; FISCHER, A; ULLMAN, U. Expression of putative virulence factors by clinical isolates of *Klebsiella planticola*. **Journal of medical microbiology**, v. 49, n. 2, p. 115–9, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10670561>>. .

PODSCHUN, R.; PENNER, I.; ULLMANN, U. Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes. **Microbial pathogenesis**, v. 13, n. 5, p. 371–9, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1338474>>. .

PODSCHUN, R.; PIETSCH, S.; HO, C.; ULLMANN, U. Incidence of *Klebsiella* Species in Surface Waters and Their Expression of Virulence Factors. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 67, n. 7, p. 3325–3327, 2001.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp . as Nosocomial Pathogens: Epidemiology , Taxonomy , Typing Methods , and Pathogenicity Factors *Klebsiella* spp . as Nosocomial Pathogens: Epidemiology , Taxonomy , Typing Methods , and Pathogenicity Factors. , v. 11, n. 4, 1998a.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 589–603, 1998b. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=88898&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

POLOTTO, M.; CASELLA, T.; LUCCA OLIVEIRA, M. G. DE; et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC infectious diseases**, v. 12, p. 176, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3512492&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30/1/2014.

POMPILIO, A; CATAVITELLO, C.; PICCIANI, C.; et al. Subinhibitory concentrations of moxifloxacin decrease adhesion and biofilm formation of *Stenotrophomonas maltophilia* from cystic fibrosis. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. Pt 1, p. 76–81, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19762476>>. Acesso em: 12/2/2014.

POOLE, K. Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Trends in microbiology**, v. 20, n. 5, p. 227–34, 2012. Elsevier

Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424589>>. Acesso em: 3/11/2012.

POUR, N. K.; DUSANE, D. H.; DHAKEPHALKAR, P. K.; et al. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 62, n. 3, p. 328–38, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21569125>>. Acesso em: 21/11/2012.

PUCCI, M. J.; BUSH, K. Investigational antimicrobial agents of 2013. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 4, p. 792–821, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24092856>>. Acesso em: 21/1/2014.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–58, table of contents, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1932750&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3/11/2012.

RASHEED, J. K.; ANDERSON, G. J.; YIGIT, H.; et al. Characterization of the extended-spectrum beta-lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2382–8, 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=90073&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

RASHEED, J. K.; JAY, C.; METCHOCK, B.; et al. Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 647–53, 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=163766&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

RASHEED, J. K.; KITCHEL, B.; ZHU, W.; et al. New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, United States. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 6, p. 870–8, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23743543>>. .

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 9, n. 2, p. 117–28, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20081869>>. Acesso em: 26/1/2014.

REGUÉ, M.; HITA, B.; PIQUÉ, N.; et al. A Gene , uge , Is Essential for *Klebsiella pneumoniae* Virulence A Gene , uge , Is Essential for *Klebsiella pneumoniae* Virulence. ,2004.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ, L.; SILVA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. **Systematic and**

applied microbiology, v. 27, n. 1, p. 27–35, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15053318>>. .

ROSSOLINI, G. M.; CONDEMI, M. A.; PANTANELLA, F.; et al. Metallo-beta-Lactamase Producers in Environmental Microbiota : New Molecular Class B Enzyme in *Janthinobacterium lividum*. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 45, n. 3, p. 837–844, 2001.

SACHA, P.; WIECZOREK, P.; HAUSCHILD, T.; et al. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*--a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. **Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society**, v. 46, n. 2, p. 137–42, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18519228>>. Acesso em: 30/1/2014.

SADER, H. S.; CASTANHEIRA, M.; MENDES, R. E.; et al. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **International journal of antimicrobial agents**, v. 25, n. 1, p. 57–61, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15620827>>. Acesso em: 23/11/2012.

SAHLY, H.; NAVON-VENEZIA, S.; ROESLER, L.; et al. Extended-spectrum beta-lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3029–34, 2008a. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2533491&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/11/2012.

SAHLY, H.; NAVON-VENEZIA, S.; ROESLER, L.; et al. Extended-spectrum beta-lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3029–34, 2008b. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2533491&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/11/2012.

SAHLY, H.; PODSCHUN, R.; OELSCHLAEGER, T. A; et al. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 12, p. 6744–9, 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=97775&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

SALADIN, M.; CAO, V. T. B.; LAMBERT, T.; et al. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. **FEMS microbiology letters**, v. 209, n. 2, p. 161–8, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007800>>. .

SAMAHA-KFOURY, J. N.; ARAJ, G. F. Recent developments in β - lactamases and extended spectrum β -lactamases. **British Medical Journal**, v. 327, p. 1209–1213, 2003.

SCHEMBRI, M. A.; BLOM, J.; KROGFELT, K. A.; KLEMM, P. Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. **American Society for Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 4626–4633, 2005.

SCHROLL, C.; BARKEN, K. B.; KROGFELT, K. A.; STRUVE, C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. **BMC microbiology**, v. 10, p. 179, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2911432&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

SHARON, N. Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. **FEBS letters**, v. 217, n. 2, p. 145–57, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2885220>>. .

SINGHAI, M.; MALIK, A.; SHAHID, M.; MALIK, M. A.; GOYAL, R. A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. **Journal of global infectious diseases**, v. 4, n. 4, p. 193–8, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3543538&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14/1/2014.

STAHLHUT, S. G.; CHATTOPADHYAY, S.; STRUVE, C.; et al. Population variability of the FimH type 1 fimbrial adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 6, p. 1941–50, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2648365&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/11/2012.

STAHLHUT, S. G.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A.; REISNER, A. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 65, n. 2, p. 350–9, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3410544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/11/2012.

STANDISH, A. J.; SALIM, A. A.; ZHANG, H.; CAPON, R. J.; MORONA, R. Chemical inhibition of bacterial protein tyrosine phosphatase suppresses capsule production. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36312, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3356977&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30/1/2014.

STEINMANN, J.; KAASE, M.; GATERMANN, S.; et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. **Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 16, n. 33, p. 1–6, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21871227>>. .

STRUVE, C.; BOJER, M.; KROGFELT, K. A. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. **Infection and immunity**, v. 77, n. 11, p. 5016–24, 2009. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2772557&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3/11/2012.

STRUVE, C.; KROGFELT, K. A. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Environmental microbiology**, v. 6, n. 6, p. 584–90, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15142246>>. Acesso em: 2/11/2012.

SUBRAMANIAN, P.; SHANMUGAM, N.; SIVARAMAN, U.; KUMAR, S.; SELVARAJ, S. Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. **The Australasian medical journal**, v. 5, n. 7, p. 344–8, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3412999&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

TARKKANEN, A M.; ALLEN, B. L.; WILLIAMS, P. H.; et al. Fimbriation, capsulation, and iron-scavenging systems of *Klebsiella* strains associated with human urinary tract infection. **Infection and immunity**, v. 60, n. 3, p. 1187–92, 1992. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=257611&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

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 cells. **Infection and immunity**, v. 65, n. 4, p. 1546–9, 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=175168&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

TARQUINIO, K.; CONFREDA, K.; SHURKO, J.; LAPLANTE, K. Activity of tobramycin and polymyxin-E against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm coated medical grade endotracheal tubes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, , n. December, p. 1–26, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24379207>>. Acesso em: 17/1/2014.

TRENTIN, D. S.; SILVA, D. B.; AMARAL, M. W.; et al. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e66257, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3679062&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27/8/2013.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. OXA-type carbapenemases. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 373–83, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16446375>>. Acesso em: 3/11/2012.

WEBB, J. S.; GIVSKOV, M.; KJELLEBERG, S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 578–585, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527403001504>>. Acesso em: 16/10/2012.

WEI, Z.-Q.; DU, X.-X.; YU, Y.-S.; et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 763–5, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1797727&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3/11/2012.

WILKSCH, J. J.; YANG, J.; CLEMENTS, A.; et al. MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 8, p. e1002204, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3161979&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/11/2012.

WILLIAMS, P.; LAMBERT, P. A; BROWN, M. R.; JONES, R. J. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. **Journal of general microbiology**, v. 129, n. 7, p. 2181–91, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6195306>>. .

WIRTH, F. W. .; , PICOLI, S. U. .; , CANTARELLI, VLADEMIR V.1, 2 , GONÇALVES, ANA L.S.1 , BRUST, FLÁVIA R.3 , SANTOS, LIEGE M.O.3 AND BARRETO, M. F. . Metallo- β β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from Southern Brazil. **BJID**, v. 13, p. 170–172, 2009.

WITKOWSKA, D.; MIESZAŁA, M.; GAMIAN, A.; et al. Major structural proteins of type 1 and type 3 *Klebsiella* fimbriae are effective protein carriers and immunogens in conjugates as revealed from their immunochemical characterization. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 45, n. 2, p. 221–30, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15949924>>. Acesso em: 25/10/2012.

WRIGHT, G. Mechanisms of resistance to antibiotics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, n. 5, p. 563–569, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1367593103001066>>. Acesso em: 9/11/2012.

WU, M.-C.; LIN, T.-L.; HSIEH, P.-F.; YANG, H.-C.; WANG, J.-T. Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e23500, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3155550&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25/10/2012.

XU, J.; LI, W.; CHEN, X.; ZHOU, Y. *Klebsiella alba* sp . nov ., a novel pesticide-tolerant bacterium from a heavily polluted environment. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 247, n. 56, p. 241–247, 2010. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam/56/3/56_3_241/_article>. .

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase , KPC-1 , from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.

YONG, D.; TOLEMAN, M. A; GISKE, C. G.; et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046–54, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2786356&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 29/4/2014.

ZOTTOLA, E. A; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern? **International journal of food microbiology**, v. 23, n. 2, p. 125–48, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7848776>>.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Artigo em português (nas normas da revista *Current Microbiology*)

Efeito da cefotaxima, ceftazidime e amicacina na formação de biofilme por isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* multidroga-resistentes portadores de diferentes genes que codificam β -lactamases e genes de virulência

Autores:

Catarina Fernandes de Freitas¹

Dyana Leal Veras²

Grasielle Vaz da Silva³

Fernanda Cristina Gomes de Lima¹

Rafael José Ribeiro Padilha⁴

Ana Paula Sampaio Feitosa¹

Luiz Carlos Alves^{2,4}

Fábio André Brayner dos Santos^{2,4}

¹Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical Universidade Federal de Pernambuco

²Departamento de Parasitologia – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ CPqAM-FIOCRUZ – Brasil.

³Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UPE

⁴Setor de Microscopia eletrônica/Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-Universidade Federal de Pernambuco – LIKA/UFPE – Brasil

*Endereço para correspondência:

Catarina Fernandes de Freitas

Av. Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária - Recife - PE – Brasil.

CEP: 50670-901

Telefone: (81) 2126-8527. E-mail: catarinaffreitas@gmail.com

Fábio André Brayner dos Santos

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/Fiocruz

Av. Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária - Recife - PE – Brasil.

CEP: 50670-420 Caixa Postal: 7472

Telefone: (81) 2101-27823. E-mail: brayner@cpqam.ficoruz.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a presença dos genes de resistência *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}, e virulência *cps*, *fimH* e *mrkD*, e a capacidade de formar biofilme por 9 isolados de *Klebsiella pneumoniae* multidroga-resistente na ausência e presença de antibióticos. A formação de biofilme na superfície de catéteres na presença e ausência da cefotaxima, ceftazidima e amicacina, foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Pelo teste de macrodiluição em caldo todos os isolados foram resistentes a cefotaxima e ceftazidima e apenas 3 foram resistentes a amicacina. A genotipagem por ERIC-PCR demonstrou quatro perfis genéticos não relacionados. Sete dos 9 isolados foram positivos para os genes de resistência *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{KPC}, e seis para o *bla*_{CTX-M}. Todos os isolados foram positivos para os genes de virulência *cps* e *mrkD* e seis para *fimH*. A MEV demonstrou células aderidas, formando biofilme por todos os isolados na ausência de antibióticos. Alguns isolados não formaram biofilme quando submetidos aos antibióticos testados. Em 2 isolados a capacidade de formar biofilme foi induzida pela presença dos antibióticos. Embora os isolados sejam resistentes aos antibióticos foi possível observar diminuição do número de células aderidas e da formação de biofilme por isolados de *K. pneumoniae* portadores de diferentes β -lactamases e de fatores de virulência, os quais apresentaram comportamentos distintos, enquanto alguns inibiram outros favoreceram a formação de biofilme, dependendo do isolado e do antibiótico utilizado.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*, biofilme, amicacina, ceftazidima, cefotaxima

INTRODUÇÃO

Infecções causadas por isolados de *Klebsiella pneumoniae* com perfil fenotípico de resistência à cefalosporinas de terceira e a carbapenêmicos possuem ampla correlação com a presença de ESBLs (Extended Spectrum β -lactamases) do tipo SHV, TEM e CTX-M e mais recentemente com a carbapenemase do tipo KPC. Adicionalmente, outras carbapenemases do tipo VIM, IMP e SPM têm sido descritas em isolados de *K. pneumoniae* obtidos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IrAS) [1-5].

A patogenicidade de isolados de *K. pneumoniae* pode ser aumentada devido a presença de diferentes fatores de virulência, incluindo a produção de cápsula polissacarídica que confere proteção contra a fagocitose e a produção de adesinas fimbriais e não fimbriais, facilitando a aderência bacteriana à superfícies de tecidos específicos e à superfícies abióticas como cateteres, contribuindo para a formação de biofilme nesta espécie bacteriana [6, 7].

O uso de dispositivos médicos invasivos favorecem a formação de biofilme por fornecer uma superfície para as adesinas bacterianas se fixarem [6]. *K. pneumoniae* tem sido relatada causando infecções relacionadas à dispositivos médicos e à produção de biofilme [8-10].

Estudos *in vitro*, demonstraram que a exposição a concentrações sub-mínima inibitória (sub-CIMs) de moxifloxacina e colistina podem estar associada a uma diminuição na capacidade de formação de biofilme em superfícies de poliestireno, o que pode levar a uma maior susceptibilidade ao sistema imunológico e a terapia com antibióticos, sugerindo que estes podem não matar a bactéria ou causar alterações morfológicas, mas afetam as propriedades associadas à virulência bacteriana [11, 12].

Diante da alta resistência apresentada por isolados bacterianos de diferentes espécies e da busca por uma terapia adequada, tem-se utilizado alternativamente antimicrobianos em associação para o tratamento de infecções por isolados com perfil multidroga-resistente (MDR) [13].

Devido a importância da terapia com antibióticos β -lactâmicos e aminoglicosídeos em casos de infecções por isolados de *K. pneumoniae* MDR e da grande associação de biofilmes bacterianos em IrAS, este estudo teve o objetivo de determinar a capacidade de isolados de *K. pneumoniae* portadores de diferentes genes de resistência e virulência, formarem biofilme quando submetidos ou não a antibióticos β -lactâmicos e ao aminoglicosídeo amicacina sozinho e em associação com a ceftazidima, visando determinar a interferência destes antibióticos na formação do biofilme por isolados de *K. pneumoniae*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados bacterianos

Para realização deste estudo foram analisados nove isolados de *K. pneumoniae*, os quais foram identificados bioquimicamente e tiveram o perfil de susceptibilidade determinado pelo sistema automatizado VITEK[®] 2 (BioMérieux) (tabela 1). Os isolados foram obtidos de pacientes internados de dois hospitais públicos da cidade de Recife-PE, nos anos de 2011 e 2012.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM de todos os isolados frente cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) e amicacina (AMC) foi confirmada manualmente pelo teste de macrodiluição em caldo, segundo as normas e critérios interpretativos do CLSI (2013). As cepas de referência de *K. pneumoniae* ATCC 700603 e de *Escherichia coli* ATCC 25922 foram utilizadas como controle de qualidade.

Extração de DNA e PCR para detecção dos genes de resistência e virulência

A extração de DNA total foi realizada utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA purification Kit* (Promega), segundo instruções do fabricante. As reações de amplificação para os genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{KPC}*, *cps*, *fimH* e *mrkD* foram realizadas utilizando um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 20 ng/µl, 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (GeHealthcare), 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmol dos primers, além de 2,5 µl de tampão (10x). As amplificações foram realizadas em termociclador (Genepro, Bioer), utilizando a seguinte ciclagem: 5 minutos a 96°C para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto a 96°C para desnaturação, 1 minuto em temperatura específica para cada primer (tabela 1) e 1 minuto a 72°C para extensão. Após os 35 ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE.

ERIC-PCR

A análise da similaridade genética foi realizada pelo método de ERIC-PCR, utilizando os primers ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') [14]. As reações foram preparadas com um volume de 25 µl contendo 2,5 mM MgCl₂, 50 µM de cada dNTP, 0,3 µM de cada primer, 5 µl da amostra de DNA e 1,5 U *Taq* DNA polymerase (Promega). As amplificações foram realizadas com 30 ciclos, com desnaturação inicial à 94 °C por 1 segundo, anelamento a 52 °C durante 10 segundos e extensão a 72 °C por 35 segundos, seguidos por uma extensão final a 72 °C durante 4 minutos [15]. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão TBE, fotodocumentados para posterior construção de um dendograma através do programa PAST.

Formação de biofilme

A avaliação da formação de biofilme foi realizada em todos os 9 isolados de *K. pneumoniae* conforme metodologia descrita por Pour et al. (2011), com modificações. Para a determinação da capacidade dos isolados formarem biofilme em caldo BHI e Mueller Hinton separadamente sem a presença de antibióticos (controle), um ml de cultura com crescimento bacteriano foi transferida para erlenmeyers contendo um pedaço de catéter de aproximadamente 1 cm e 50 ml de meio, para incubação a 37°C por 72 horas sob duas condições: sem agitação e sob rotação de 200 rpm [12].

Todos os isolados (K483, K652, K952, K786, K330, K3294, K38727, K39915, K1) foram analisados quanto a capacidade de formarem biofilme na superfície de catéteres quando submetidos a ceftazidima e cefotaxima separadamente, um ml do crescimento bacteriano, contendo $1,5 \times 10^8$ células, foi transferido para erlenmeyers contendo os antibióticos, um pedaço de catéter de aproximadamente 1 cm e 50 ml de caldo Mueller Hinton. Outro ensaio foi realizado com os isolados K1, K652 e K483 que foram resistentes a amicacina, os quais

também foram submetidos a este antibiótico sozinho e em combinação com a ceftazidima. As concentrações utilizadas dos antibióticos foram escolhidas para simular as concentrações clinicamente relevantes de ceftazidima (27 µg/ml), cefotaxima (102 µg/ml) e amicacina (4 µg/ml) [16-18]. Os isolados foram incubados a 37°C por 72 horas sob rotação de 200 rpm.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise da capacidade dos isolados de *K. pneumoniae* formarem biofilme nas condições descritas anteriormente, foi realizada pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Após o crescimento bacteriano os cateteres foram lavados, fixados, pós-fixados, desidratados e levados ao ponto crítico para a secagem do material e montagem em suportes metálicos. Em seguida, foi realizada a metalização e visualização das amostras em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5600 LV.

RESULTADOS

Resistência aos antimicrobianos

Pelo teste de macrodiluição em caldo, todos os isolados de *K. pneumoniae* apresentaram resistência ou resistência intermediária a cefotaxima e ceftazidima, e apenas três foram resistentes ou resistentes intermediários à amicacina (Tabela 2).

Presença dos genes de virulência e resistência

Todos os isolados de *K. pneumoniae* apresentam o operon gênico responsável pela produção de CPS (*cps*) e o gene codificante da fimbria tipo 3 (*mrkD*). Entre os nove isolados analisados, seis apresentaram o gene *fimH*, envolvido com a produção de fimbria tipo 1. Adicionalmente, sete dos nove isolados foram positivos para os genes de resistência *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ou *bla*_{KPC} e seis para o gene *bla*_{CTX-M} (tabela 3). Os isolados K952, K483 e K38727 apresentaram simultaneamente todos os genes de resistência e virulência pesquisados.

Genotipagem pela ERIC-PCR

Os isolados de *K. pneumoniae* foram agrupados em cinco grupos, devido apresentarem similaridade entre 56 a 72% (Fig 1). No primeiro grupo de isolados (G1), os isolados K3300 e K3294 apresentam forte relação genética (similaridade de 96%), diferindo em apenas uma banda. No segundo grupo (G2) puderam ser incluídos três isolados, onde dois (K39915 e K1) apresentaram perfil genético com similaridade de 96% e o outro (K38727) de 88%. No terceiro grupo (G3), os isolados K483 e K952 apresentaram 4 bandas diferentes, com similaridade de 80%. Os isolados K652 e K786 apresentaram pouca relação genética entre si por diferirem em cinco bandas, apresentando baixa similaridade genética (64%), sendo agrupados em grupos distintos (G4 e G5).

Formação de Biofilme

As células controle do isolado K483 de *K. pneumoniae* apresentaram-se alongadas, provavelmente devido o estresse provocado pela agitação, além de fortemente aderidas com pouca matriz extracelular. Após a submissão a ceftazidima pode-se observar inúmeras células aderidas e arrançadas em camadas, produzindo intensa quantidade de matriz extracelular (MEC), indicando formação de biofilme. A submissão deste isolado a cefotaxima, amicacina, e amicacina combinada a ceftazidima, provocou inibição da formação do biofilme

quando comparada a ceftazidima sozinha, onde as células apresentaram-se aderidas a superfície do cateter, produzindo, no entanto, pouca MEC (Fig 2).

O isolado K38727 de *K. pneumoniae* formou biofilme sem submissão à antibióticos, com poucas células aderidas além de pouca MEC. Quando submetido aos antibióticos ceftazidima e cefotaxima pode-se observar células aderidas e arrançadas em camadas, produzindo intensa quantidade de MEC, principalmente quando submetidos a ceftazidima (Fig 3 A-C).

O isolado K952 de *K. pneumoniae* em condições controle, formou biofilme com grande quantidade de MEC e de células aderidas à superfície do cateter. Quando submetido à ceftazidima, o isolado ainda foi capaz de formar biofilme, apresentando no entanto, menor quantidade de MEC e número de células aderidas. A submissão deste isolado a cefotaxima inibiu a adesão das células bacterianas à superfície do cateter e consequentemente a formação do biofilme (Fig 3 D-E).

O isolado K3294 em condições controle formou biofilme com grande número de células aderidas e MEC. A submissão a ceftazidima diminuiu intensamente a adesão celular à superfície do cateter inibindo a formação do biofilme. Quando submetido à cefotaxima, as células apresentaram estágio inicial de formação de biofilme (Fig 4)

O isolado K3300, apresentou formação de biofilme na ausência dos antibióticos. Quando submetido à ceftazidima, as células apresentaram estágio inicial de formação de biofilme, caracterizado pela forte adesão celular à superfície do cateter e baixa quantidade de MEC. Quando submetido a cefotaxima, embora grande número de células tenham se aderido, não houve formação de MEC ou biofilme (Fig 5).

O isolado KPC1, na ausência de antibióticos, foi observado poucas células aderidas, apresentando estágio inicial de formação de biofilme com quantidade ainda escassa de MEC. Quando submetido a ceftazidima, cefotaxima, amicacina e ceftazidima combinada a amicacina, houve um aumento significativo do número de células aderidas e de MEC, ocorrendo indução da formação de biofilme (Fig 6).

Os isolados K39915, K652 e K786 apresentaram formação de biofilme apenas quando submetidos às condições controle, sem antibióticos.

DISCUSSÃO

A formação de biofilme e sobrevivência bacteriana e diferentes superfícies tem profundas implicações para os pacientes, pois os microrganismos que crescem formando biofilmes são significativamente menos susceptíveis aos antibióticos e às defesas do hospedeiro do que as formas planctônicas dos mesmos microrganismos. Adicionalmente, a resistência antimicrobiana é um grande problema mundial de saúde, sendo a produção de β -lactamases um dos principais mecanismos de resistência. Assim, os mecanismos de virulência e resistência produzidos por *K. pneumoniae* contribuem para a patogenicidade, agravando o quadro clínico dos pacientes [19].

As CIMs dos antibióticos cefotaxima e ceftazidima frente a maioria dos isolados analisados neste estudo foi elevada, nos quais foram encontrados os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX} e *bla*_{KPC}. Esses genes codificam a produção de enzimas como as β -lactamases e as carbapenemases que atuam inativando antibióticos como as cefalosporinas e os carbapenêmicos. Assim como no presente estudo, essas enzimas têm sido frequentemente detectadas em isolados de *K. pneumoniae* resistentes à ceftazidima e cefotaxima [15, 20-22].

A presença dos genes para cápsula polissacarídica e fímbrias do tipo 3 foi verificada em todos os

isolados, e do gene *fimH* em sete dos nove isolados. Esses mecanismos de virulência são comuns e favorecem a formação de biofilme em isolados de *K. pneumoniae* [23], já que são estruturas importantes para adesão [24-26]. Em nosso estudo foi possível verificar que os isolados que foram capazes de se aderir e formar biofilme na superfície de catéteres apresentavam os genes *mrkD* e *cps*. Além disso, a ausência do gene *fimH* em três isolados não impediu a formação de biofilme, mas quando submetidos à antibióticos, dois destes não formaram biofilme, esse gene tem sido descrito na literatura como associado à formação de biofilme, uma vez que este é importante para adesão celular [6,27,28]. Entretanto, os isolados K3300 e K3294, quanto a formação de biofilme apresentaram um comportamento semelhante e um deles não possui o gene *fimH*.

Alguns isolados analisados neste estudo apresentaram perfis de susceptibilidade semelhantes, com a presença dos mesmos genes de resistência e virulência, a genotipagem pela ERIC-PCR mostrou 5 perfis genéticos fortemente relacionados, corroborando com os achados referente a susceptibilidade e o perfil genético apresentado. Padrão de bandejamento e perfis genéticos diferentes obtidos por ERIC-PCR foram relatados anteriormente em isolados de mesma espécie bacteriana, indicando uma diversidade genética dentro da espécie [15,29,30].

Neste estudo, pode-se verificar a capacidade dos isolados formarem biofilme, também quando submetidos a sub-CIMs de cefotaxima, ceftazidima e amicacina isoladamente e da ceftazidima associada com amicacina. Um estudo realizado com isolados de *K. pneumoniae* para verificar a Concentração Mínima de Eliminação do Biofilme (CMEB) dos antibióticos gentamicina e colistina, mostrou que as células presentes no biofilme formado não eram mais resistentes que as células planctônicas à gentamicina, já em relação à colistina os biofilmes formados se mostraram 2-3 vezes mais resistente [31], mostrando assim que os antibióticos deiferentes podem interferir na formação do biofilme de forma diferente.

A cefotaxima, ceftazidima, amicacina e ceftazidima associado a amicacina neste trabalho, aumentaram a capacidade de formação de biofilme pelo isolado K1. A indução de formação de biofilme pela ceftazidima já foi relatada em isolados de *Proteus mirabilis* [32] e pela cefotaxima em isolados de *Salmonella enterica* [33]. Em estudo realizado por Bagge et al., 2004, o antibiótico imipenem induziu a formação de biofilme por isolados de *P. aeruginosa* e a expressão de β -lactamases, tornando necessária a inclusão de avaliação da capacidade de isolados clínicos formarem biofilmes nos laboratórios clínicos a fim de melhorar antibioticoterapia realizada [34]. Essa indução também ocorreu no isolado K38727 deste estudo, em relação à cefotaxima e ceftazidima, esses antibióticos aumentaram a formação de biofilme em relação ao controle. Essa indução mostra que os antibióticos podem atuar não só para matar as bactérias, mas também como moléculas de sinalização que podem regular comunidades microbianas, como os biofilmes [35]. O que é preocupante, visto que as bactérias presentes no biofilme são geralmente mais resistente às drogas [31,36].

A eficácia *in vivo* da combinação de ceftazidima e amicacina frente a isolados de *Pseudomonas aeruginosa* causando endocardites em coelhos foi demonstrada com a diminuição significativa do número de colônias e uma porcentagem maior de sobrevivência dos animais [37]. Dales et al. (2009), verificaram a eficácia *in vitro* da associação da ceftazidima com amicacina frente a biofilmes formados por 14% dos isolados de *Burkholderia cepacia* provenientes de pacientes portadores de fibrose cística com exacerbação pulmonar [38]. A diminuição da formação de biofilme devido a sub-CIMs dos antibióticos ceftazidima e amicacina também foi observada por Di Martino e Bret (2014) [39]. No presente estudo, tanto a associação da ceftazidima com amicacina, quanto a cefotaxima usada isoladamente foram mais eficazes, por diminuírem a formação de

biofilme, quando comparadas a ceftazidima frente ao isolado K483, resistente aos três antibióticos, o qual apresentou todos os genes de resistência e virulência pesquisados.

Segundo Wojnicz e Tichaczek-Goska (2013), sub-CIMs de amicacina podem ser úteis no tratamento de infecções associada a formação de biofilme por *Escherichia coli* [40]. Em outro estudo, houve redução da penetração da cefotaxima e oxacilina, não ocorrendo alteração em relação a amicacina e a ciprofloxacina em biofilmes formados por isolados de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* [41]. Outros autores sugerem que a amicacina pode inibir os mecanismos de virulência bacteriana [42]. Estes estudos podem explicar a possível ação da amicacina no biofilme formado pelo isolado K483.

O isolado K786 não possui os genes bla_{CTX-M} , bla_{SHV} ou bla_{TEM} e apresentou menor resistência a ceftazidima, assim como o isolado K39915 mas que não possui somente o gene bla_{CTX-M} , em relação ao isolado K786, e assim como o isolado K652, que apresentou os genes bla_{CTX-M} e bla_{KPC} , não possui o gene *fimH*. Portanto a ausência desses genes bla_{SHV} , bla_{TEM} , bla_{CTX-M} ou *fimH* pode ter contribuído para a não formação de biofilme pelos isolados quando submetidos aos antibióticos.

O isolado K3294 não portador do gene bla_{KPC} e *fimH* que formou biofilme nas condições controle, quando submetido à ceftazidima não formou biofilme mas quando submetido à cefotaxima, apresentou um estágio inicial de formação de biofilme. Já o isolado K3300 não portador do gene bla_{KPC} mas de *fimH*, as células apresentaram um estágio mais inicial de formação de biofilme quando submetidas à ceftazidima e não formaram biofilme quando submetidas à cefotaxima. Esses resultados sugerem que a presença do gene *fimH* no isolado K3300 talvez não tenha sido importante para melhor adesão celular, já que os dois isolados apresentaram CIMs semelhantes e apresentaram um estágio inicial de formação de biofilme quando submetidos aos antibióticos [6, 27, 28].

O isolado K952 apresentou todos os genes de resistência e virulência pesquisados com altas CIMs frente os antibióticos. No entanto, a cefotaxima foi capaz de inibir a adesão das células e formação de biofilme. Um estudo realizado por Hennequin et al. (2012) verificou também a redução do biofilme formado por isolados de *K. pneumoniae* quando submetidos a sub-CIMs de cefotaxima [7].

Embora os isolados de *K. pneumoniae* analisados neste estudo sejam resistentes aos antibióticos testados, foi possível observar que a maioria apresentou diminuição e até inibição da formação de biofilme quando submetidos a antibióticos. Já foi descrito por outros autores que o antibiótico pode não eliminar o biofilme, mas pode atuar sobre ele causando alterações nas células bacterianas [12, 43].

Nossos resultados mostraram que os isolados de *K. pneumoniae* multidroga-resistentes portadores de diferentes genes de virulência e resistência apresentaram comportamentos distintos em relação a formação de biofilme, dependendo da cepa e do antibiótico ao qual foram submetidos, o qual pode inibir ou induzir a formação de biofilme.

Tabela 1. Origem e perfil de resistência antimicrobiana dos isolados de *Klebsiella pneumoniae*.

Isolado	Fonte de isolamento	Perfil de resistência antimicrobiana
K786	Swab retal	AMP, CPM, CTX, CIP, GEN, CFO, IMP, ERT.
K652	Swab retal	AMP, CPM, CTX, CIP, GEN, CFO, IMP, ERT, MPM.
K952	Swab nasal	AMP, CPM, CTX, CIP, CFO, IMP, ERT.
K39915	Não identificada	AMP, COM, CTX, CIP, CFO, IMP, ERT, MPM.
K483	Swab nasal	AMP, CPM, CTX, CIP, CFO, IMP, ERT.
K38727	Não identificada	AMP, COM, CTX, CIP, CFO, IMP, ERT, MPM.
K1	Não identificada	AMP, COM, CTX, CIP, CFO, IMP, ERT, MPM.
K 3300	Ponta de cateter	AMP, CPM, CTX, CIP, GEN.
K 3294	Hemocultura	AMP, CPM, CTX, CIP, GEN.

AMP: ampicilina; CPM: cefepime; CTX: cefotaxima; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicin; CFO: ceftiofina; IMP: imipenem; MPM: meropenem; ERT: ertapenem

Tabela 2. Primers utilizados para detecção dos genes analisados neste estudo.

Gene	Primer (5'-3')	Referência	T.A. ^(a) (°C)
<i>bla</i> _{TEM}	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	[44]	66
	GACAGTTACCAATGCTTAATC		
<i>bla</i> _{KPC}	TGTCACTGTATCGCCGTC	[45]	68
	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC		
<i>bla</i> _{CTX-M}	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	[46]	63
	CCGCRATATGRTTGGTGGTG		
<i>bla</i> _{SHV}	GGTTATGCGTTATATTCGCC	[44]	64
	TTAGCGTTGCCAGTGCTC		
<i>cps</i>	TCCCAATTGTGACCGAAATC	[47]	63
	GCTCGCGGCACCAGCTGA		
<i>fimH</i>	CACGCAAGGCACCATTC	[48]	63
	GCTCAGAATCAACATCGGTAAC		
<i>mrkD</i>	CCACCAACTATTCCCTCGAA	[47]	59
	ATGGAACCCACATCGACATT		

^(a) Temperatura de anelamento.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima dos isolados de *K. pneumoniae* frente aos antibióticos cefotaxima, ceftazidima e ampicilina e genes de resistência e virulência detectados neste estudo.

Isolado ^a	Perfil da ERIC-PCR	CIM (μg/ml)			Gene						
		CTX	CAZ	AMC	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>mrkD</i>	<i>cps</i>	<i>fimH</i>
K786	G4	128 ^r	16 ^r	1 ^s	-	-	+	-	+	+	-
K652	G4	>256 ^r	>256 ^r	6 ^r	-	+	+	-	+	+	+
K952	G3	>256 ^r	>256 ^r	0,5 ^s	+	+	+	+	+	+	+
K39915	G2	>256 ^r	128 ^r	2 ^s	+	-	+	+	+	+	-
K483	G3	64 ^r	>256 ^r	8 ^r	+	+	+	+	+	+	+
K38727	G2	>256 ^r	128 ^r	4 ^s	+	+	+	+	+	+	+
K1	G2	64 ^r	16 ^r	>64 ^r	+	-	+	+	+	+	+
K 3300	G1	>256 ^r	128 ^r	1 ^s	+	+	-	+	+	+	+
K3294	G1	>256 ^r	>256 ^r	2 ^s	+	+	-	+	+	+	-

^a Identificação dos isolados. ^r Resistente. ^s Sensível.

Siglas: CIM - Concentração Inibitória Mínima; CTX - cefotaxima; CAZ - ceftazidima; AMC - ampicilina.

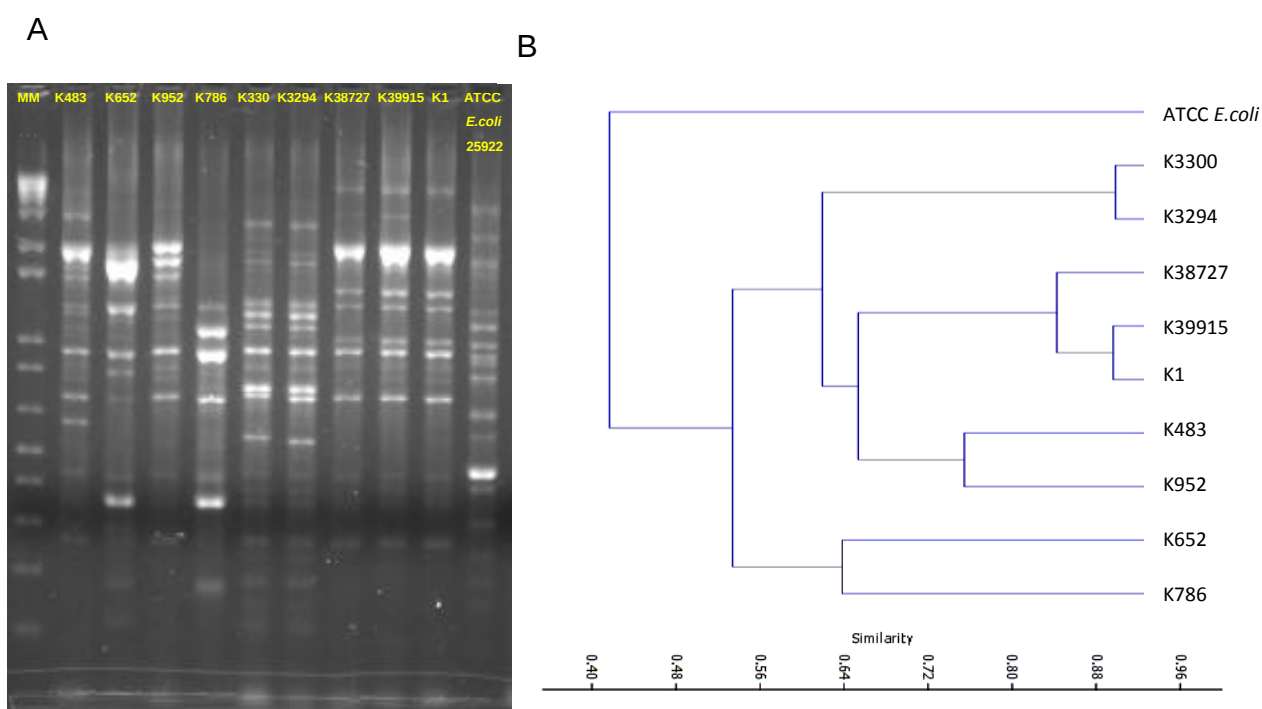


Fig 1. Tipagem pela técnica de ERIC-PCR. **A-** Gel de agarose à 1,5% representativo do produto amplificado da ERIC-PCR. Linha 1: MM- Marcador de peso molecular de 100pb; linhas 2 a 10, isolados de *K. pneumoniae*; linha 12: ATCC *E. coli* 25922. **B-** Dendrograma gerado pela ERIC-PCR, utilizando o programa PAST.

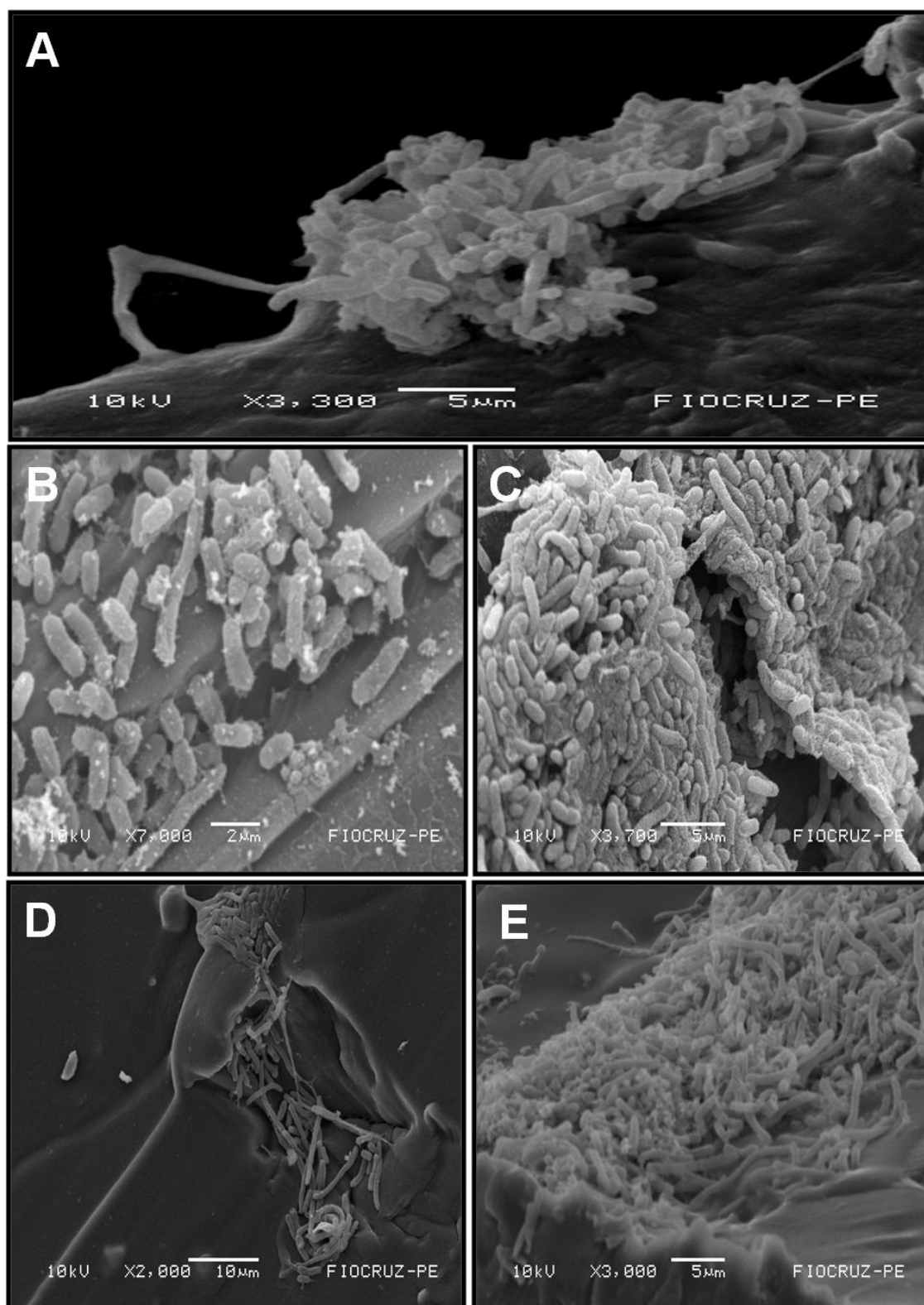


Fig 2 (A-E): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura do isolado K483. **A-** Células controle (sem antibiótico), alongadas, fortemente aderidas com grande quantidade de MEC. **B-** Células submetidas à AMC (4 µg/ml), apresentando pouca quantidade de MEC. **C-** Células submetidas à CAZ (27 µg/ml), apresentando grande quantidade de MEC e organização do biofilme bacteriano. **D-** Células submetidas à AMC (4 µg/ml) e CAZ (27 µg/ml), observar células aderidas com pouca quantidade de MEC. **E-** Células submetidas à CTX (102 µg/ml), apresentando células aderidas com pouca quantidade de MEC.

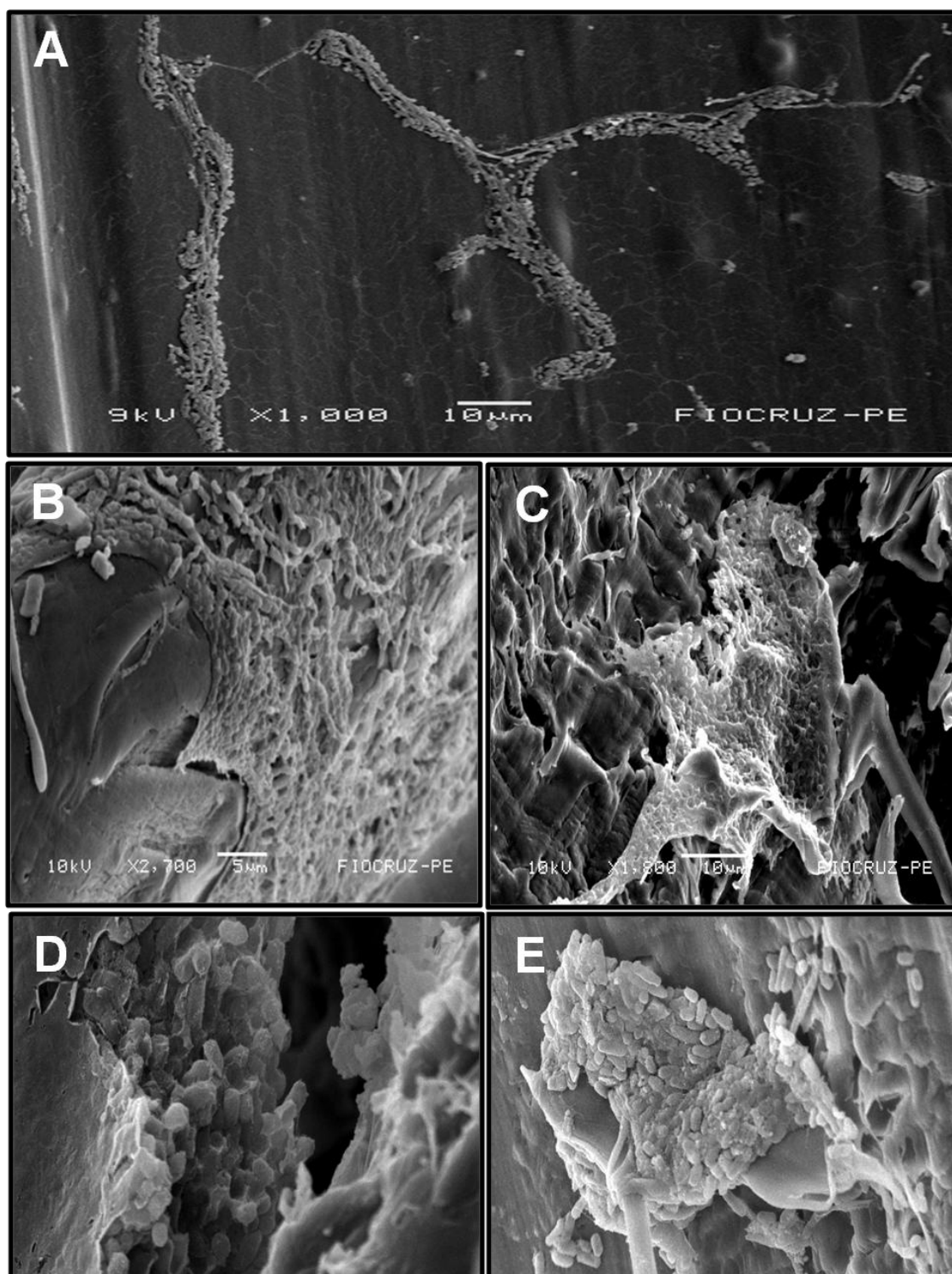


Fig 3 (A-E): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura dos isolados K38727 e K952. **A-** Células do isolado K38727 controle (sem antibiótico), formando biofilme apresentando pouca quantidade de MEC. **B-** Células do isolado K38727 submetidas à CAZ (27 µg/ml), arranjadas em camadas, apresentando intensa quantidade de MEC. **C-** Células do isolado K38727 submetidas à CTX (102 µg/ml), arranjadas em camadas, apresentando intensa quantidade de MEC. **D-** Células do Isolado K952 controle (sem antibiótico), formando biofilme com grande quantidade de MEC. **E-** Células do isolado K952 submetidas à CAZ (27 µg/ml), apresentando pouca MEC.

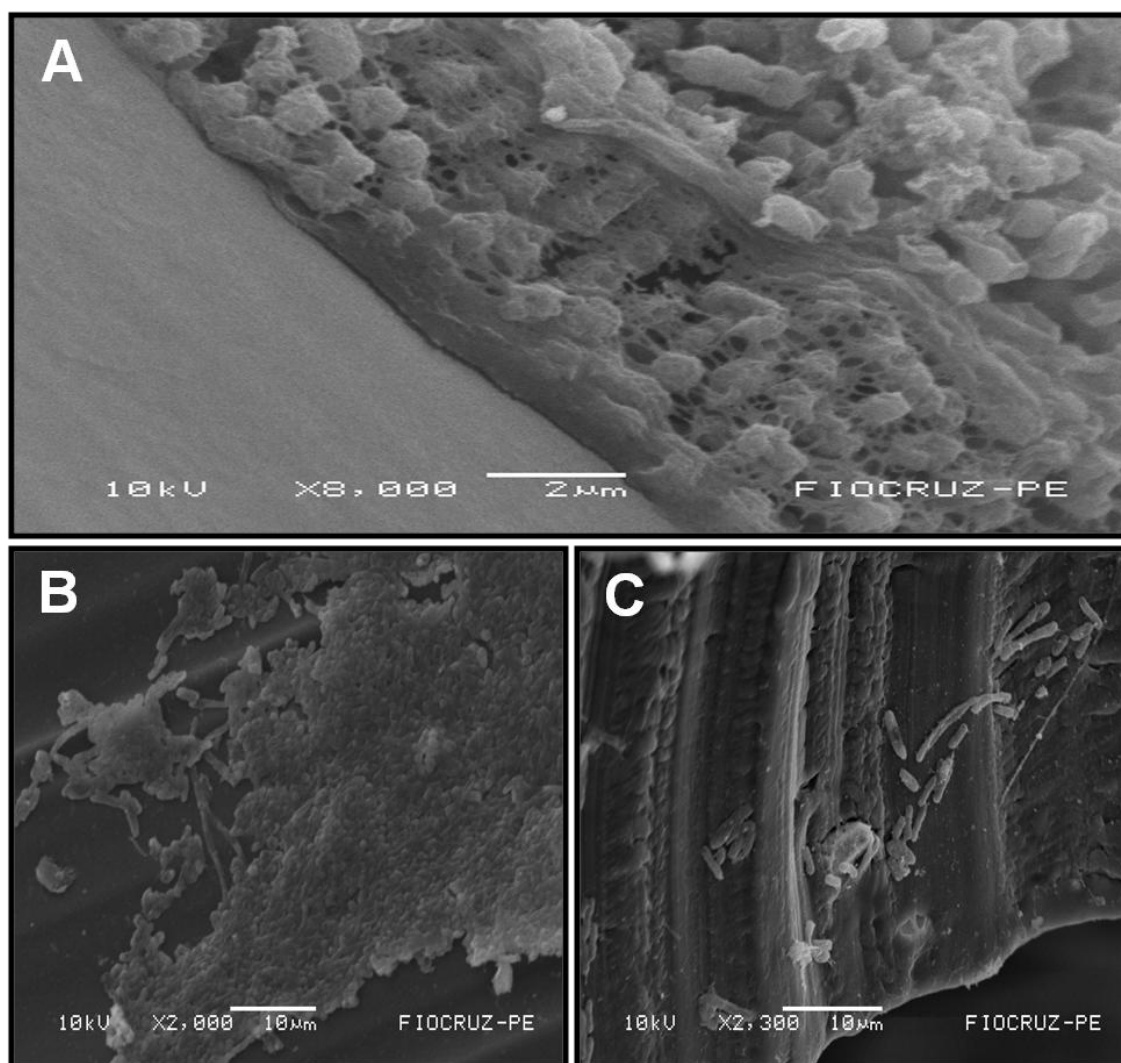


Fig 4 (A-C): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura do isolados K3294. **A-** Células controle (sem antibiótico), formando biofilme com grande quantidade de MEC. **B-** Células submetidas à CTX (102 µg/ml), em estágio inicial de formação de biofilme. **C-** Células submetidas à CAZ (32 µg/ml) aderidas, mas sem MEC.

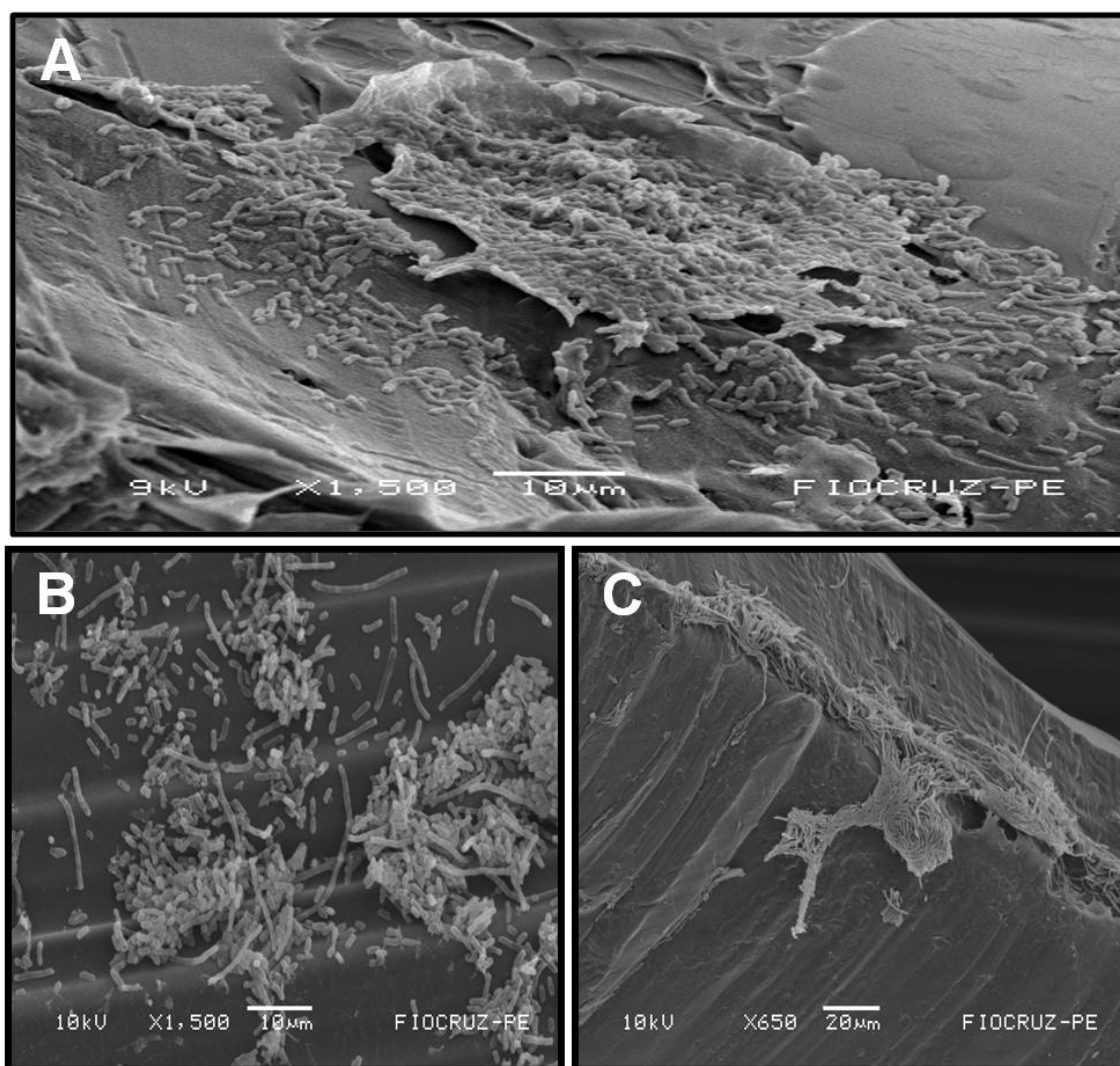


Fig 5 (A-C): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura do isolado K3300. **A-** Células controle (sem antibiótico), formando biofilme. **B-** Células submetidas à CTX (102 µg/ml), aderidas mas sem MEC. **C-** Células submetidas à CAZ (32 µg/ml), em estágio inicial de formação de biofilme.

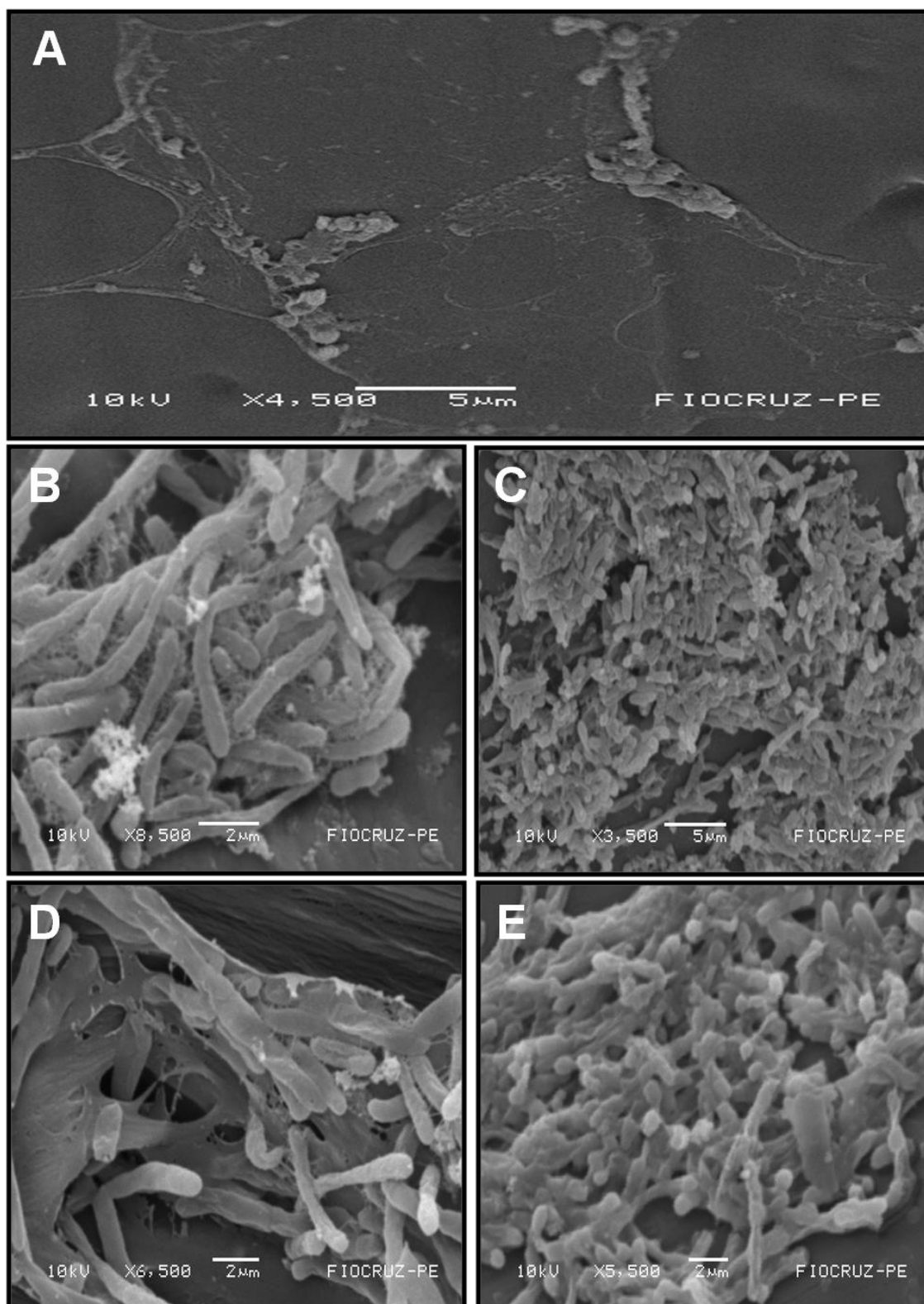


Fig 6 (A-E): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura do isolado K1. **A-** Células controle (sem antibiótico) em estágio inicial da formação de biofilme. **B-** Células submetidas à AMC (4 µg/ml), formando biofilme. **C-** Células submetidas à CAZ (27 µg/ml), formando biofilme. **D-** Células submetidas à AMC (4 µg/ml) e CAZ (27 µg/ml), formando biofilme. **E-** Células submetidas à CTX (102 µg/ml), formando biofilme.

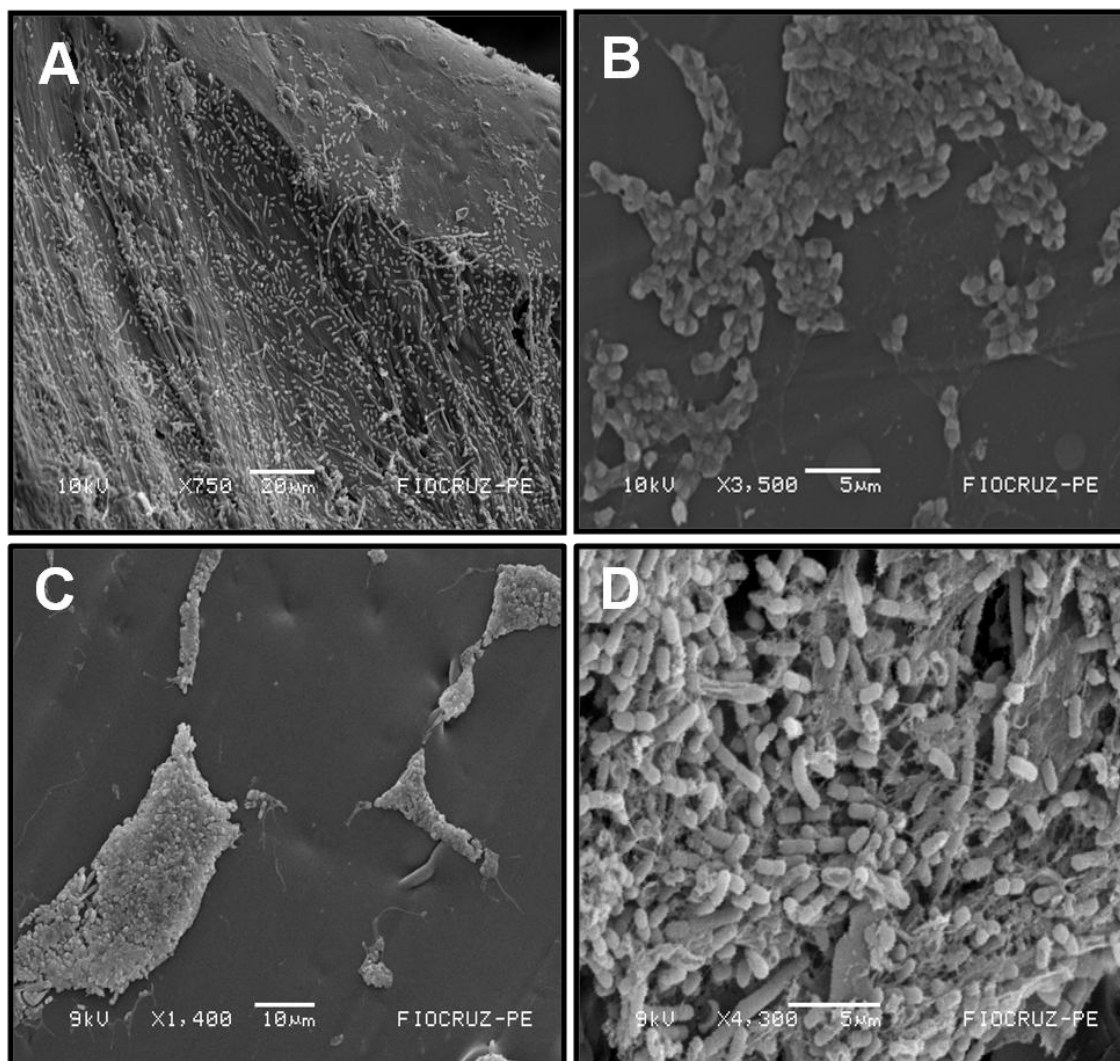


Fig 7 (A-D): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura do isolados controle (sem antibiótico) K39915, K652 e K786. **A-B-** Células do isolado K39915 aderidas. **C-** Células do isolado K652 aderidas. **D-** Células do isolado K786 aderidas.

Referências

1. PATERSON, D. L.; ROSSI, F.; BAQUERO, F.; et al. In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 965–73, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15849262>>. Acesso em: 2/11/2012.
2. BRADFORD. 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89009/>>. .
3. Chong, Y., Ito, Y., & Kamimura, T. (2011). Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 11(7), 1499–504. doi:10.1016/j.meegid.2011.06.001
4. STEINMANN, J.; KAASE, M.; GATERMANN, S.; et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. **Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 16, n. 33, p. 1–6, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21871227>>. .
5. QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–58, table of contents, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1932750&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3/11/2012.
6. STAHLHUT, S. G.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A; REISNER, A. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 65, n. 2, p. 350–9, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3410544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/11/2012.
7. HENNEQUIN, C.; AUMERAN, C.; ROBIN, F.; TRAORE, O.; FORESTIER, C. Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2123–30, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22577106>>. Acesso em: 27/10/2012.
8. HOCEVAR SN, EDWARDS JR, HORAN TC, MORRELL GC, IWAMOTO M, L. F. Device-associated infections among neonatal intensive care unit patients : incidence and associated pathogens reported to the National Healthcare Safety Network , 2006-2008 . **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 33, n. 12, p. 1200–1206, 2012.
9. NELSON, E. C.; SEGAL, H.; ELISHA, B. G. Outer membrane protein alterations and blaTEM-1 variants: their role in beta-lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 899–903, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613957>>. Acesso em: 16/2/2014
10. SINGHAI, M.; MALIK, A.; SHAHID, M.; MALIK, M. A.; GOYAL, R. A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. **Journal of global infectious diseases**, v. 4, n. 4, p. 193–8, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3543538&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14/1/2014.
11. POMPILIO, A; CATAVITELLO, C.; PICCIANI, C.; et al. Subinhibitory concentrations of moxifloxacin decrease adhesion and biofilm formation of *Stenotrophomonas maltophilia* from cystic fibrosis. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. Pt 1, p. 76–81, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19762476>>. Acesso em: 12/2/2014.
12. POUR, N. K.; DUSANE, D. H.; DHAKEPHALKAR, P. K.; et al. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 62, n. 3, p. 328–38, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21569125>>. Acesso em: 21/11/2012.
13. PAUL, M.; LADOR, A.; LEIBOVICI, L. Beta-lactam antibiotic monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis . **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 25, n. 1, p. 1–2, 2006.
14. DUAN, H.; CHAI, T.; LIU, J.; et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v. 109, n. 5, p. 511–7, 2009. Elsevier. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19349045>>. Acesso em: 28/1/2013.

15. CABRAL, A. B.; CÁSSIA, R. DE; MELO, D. A.; AMÉLIA, M.; MACIEL, V. Major Article among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife , Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 572–578, 2012.
16. ADAMIS, G.; PAPAIOANNOU, M. G.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; et al. Pharmacokinetic interactions of ceftazidime, imipenem and aztreonam with amikacin in healthy volunteers. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 2, p. 144–9, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15013039>>. Acesso em: 29/1/2013.
17. AHSMAN, M. J.; WILDSCHUT, E. D.; TIBBOEL, D.; MATHOT, R. A. Pharmacokinetics of cefotaxime and desacetylcefotaxime in infants during extracorporeal membrane oxygenation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 1734–41, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2863660&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8/1/2014.
18. HIRSCH EB, GUO B, CHANG KT, CAO H, LEDESMA KR, SINGH M, T. V. Assessment of antimicrobial combinations for *Klebsiella pneumoniae* PubMed Commons. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 5, p. 786–793, 2012.
19. BRYERS, J. D. Medical biofilms. **Biotechnol Bioeng**, v. 100, n. 1, p. 1–18, 2008.
20. LAL, P.; KAPIL, A.; DAS, B. K.; SOOD, S. Occurrence of TEM & SHV gene in extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella* sp. isolated from a tertiary care hospital. **The Indian journal of medical research**, v. 125, n. 2, p. 173–8, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17431288>>. .
21. LOPES, A. C. S.; VERAS, D. L.; LIMA, A. M. S.; MELO, R. D. C. A.; AYALA, J. bla(CTX-M-2) and bla(CTX-M-28) extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 163–7, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20428675>>. .
22. PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 300, n. 6, p. 371–9, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20537585>>. Acesso em: 27/10/2012.
23. PODSCHUN, R.; FISCHER, A; ULLMAN, U. Expression of putative virulence factors by clinical isolates of *Klebsiella planticola*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 115–9, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10670561>>. .
24. BALESTRINO, D.; GHIGO, J.-M.; CHARBONNEL, N.; HAAGENSEN, J. A J.; FORESTIER, C. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 3, p. 685–701, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18237304>>. Acesso em: 3/11/2012.
25. EVRARD, B.; BALESTRINO, D.; DOSGILBERT, A; et al. Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 1, p. 210–9, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2798207&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23/11/2012.
26. BELLIFA, S.; HASSAINE, H.; BALESTRINO, D.; et al. Evaluation of biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the University Hospital of Tlemcen , Algeria. , v. 7, n. 49, p. 5558–5564, 2013.
27. SCHEMBRI, M. A.; BLOM, J.; KROGFELT, K. A.; KLEMM, P. Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. **American Society for Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 4626–4633, 2005.
28. SAHLY, H.; PODSCHUN, R.; OELSCHLAEGER, T. A; et al. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 12, p. 6744–9, 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=97775&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .
29. MEACHAM, K. J.; ZHANG, L.; FOXMAN, B.; et al. Evaluation of Genotyping Large Numbers of *Escherichia coli* Isolates by Enterobacterial Repetitive Intergenic Evaluation of Genotyping Large Numbers of *Escherichia coli* Isolates by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5224–5226, 2003.
30. BARUS, T.; HANJAYA, I.; SADELI, J.; et al. Genetic Diversity of *Klebsiella* spp. Isolated from Tempe based on Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR). **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 20, n. 4, p. 171–176, 2013. Disponível em: <<http://journal.ipb.ac.id/index.php/hayati/article/view/7320>>. Acesso em: 12/2/2014.

31. NAPARSTEK, L.; CARMELI, Y.; NAVON-VENEZIA, S.; BANIN, E. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1–8, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24408988>>. Acesso em: 30/1/2014.
32. KWIECIŃSKA-PIRÓG, J.; BOGIEL, T.; GOSPODAREK, E. Effects of ceftazidime and ciprofloxacin on biofilm formation in *Proteus mirabilis* rods. **The Journal of antibiotics**, v. 66, n. 10, p. 593–7, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23801185>>. Acesso em: 21/1/2014.
33. MAJTÁN, J.; MAJTÁNOVÁ, L.; XU, M.; MAJTÁN, V. In vitro effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation by clinical strains of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* isolated in Slovakia. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 5, p. 1294–301, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18028358>>. Acesso em: 16/2/2014.
34. BAGGE, N.; SCHUSTER, M.; HENTZER, M.; et al. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Exposed to Imipenem Exhibit Changes in Global Gene Expression and Beta-Lactamase and Alginate Production. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1175–1187, 2004.
35. STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S. C. J. DE. Salmonella biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 502–531, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911000615>>. Acesso em: 21/1/2014.
36. MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34–9, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166241>>. .
37. PEFANIS, A.; GIAMARELLOU, H.; KARAYIANNAKOS, P.; DONTA, I. Efficacy of Ceftazidime and Aztreonam Alone or in Combination with Amikacin in Experimental Left-Sided *Pseudomonas aeruginosa* Endocarditis. ,1993.
38. Dales L , Ferris W , Vandemheen K , Aaron SD Combination antibiotic susceptibility of biofilm-grown *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. **European Society of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 10, p. 0–1, 2009.
39. BRET, L.; P, D. M. Effect of ceftazidime , amikacin and ciprofloxacin on biofilm formation by some enterobacterial clinical isolates. **Chemotherapy**, v. 50, n.5, p. 255–259, 2014.
40. WOJNICZ, D.; TICHACZEK-GOSKA, D. Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin, amikacin and colistin on biofilm formation and virulence factors of *Escherichia coli* planktonic and biofilm forms isolated from human urine. **Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 44, n. 1, p. 259–65, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3804207&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .
41. Singh R, Ray P, Das A, Sharma M (2010) Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **J Antimicrob Chemother** 65:1955–8. doi: 10.1093/jac/dkq257
42. CIRIONI, O.; GHISELLI, R.; SILVESTRI, C.; et al. Effect of the combination of clarithromycin and amikacin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in an animal model of ureteral stent infection. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 6, p. 1318–23, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21406436>>. Acesso em: 16/2/2014.
43. RASHEED, J. K.; JAY, C.; METCHOCK, B.; et al. Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 647–53, 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=163766&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .
44. YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase , KPC-1 , from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.
45. SALADIN, M.; CAO, V. T. B.; LAMBERT, T.; et al. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. **FEMS microbiology letters**, v. 209, n. 2, p. 161–8, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007800>>. .
46. HENNEQUIN, C.; FORESTIER, C. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. **Research in Microbiology**, v. 158, n. 4, p. 339–47, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17446046>>. Acesso em: 25/10/2012.
47. STAHLHUT, S. G.; CHATTOPADHYAY, S.; STRUVE, C.; et al. Population variability of the FimH type 1 fimbrial adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 6, p. 1941–50, 2009. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2648365&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
Acesso em: 2/11/2012.

APÊNDICE

APÊNDICE B

Artigo em inglês (nas normas da revista *Current Microbiology*)

Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of cefotaxima, ceftazidime and amikacin on biofilm formation by multidrug-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* carrying different β -lactamases and virulence genes

Catarina Fernandes de Freitas - Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical Universidade Federal de Pernambuco

Dyana Leal Veras - Departamento de Parasitologia – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ CPqAM-FIOCRUZ – Brasil.

Grasielle Vaz da Silva – Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UPE

Fernanda Cristina Gomes de Lima - Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical Universidade Federal de Pernambuco

Rafael José Ribeiro Padilha- Setor de Microscopia eletrônica/Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami- Universidade Federal de Pernambuco – LIKA/UFPE – Brasil

Ana Paula Sampaio Feitosa – Departamento de Medicina Tropical – Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical Universidade Federal de Pernambuco

Luiz Carlos Alves - Departamento de Parasitologia – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ CPqAM-FIOCRUZ – Brasil.

Fábio André Brayner dos Santos - Departamento de Parasitologia – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ CPqAM-FIOCRUZ – Brasil.

*Corresponde address:

Catarina Fernandes de Freitas

Av. Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária - Recife - PE – Brasil.

CEP: 50670-901

Telefone: (81) 2126-8527. E-mail: catarinaffreitas@gmail.com

Fábio André Brayner dos Santos

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/Fiocruz

Av. Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária - Recife - PE – Brasil.

CEP: 50670-420 Caixa Postal: 7472

Telefone: (81) 2101-27823. E-mail: brayner@cpqam.ficoruz.br

ABSTRACT

We aim to investigate the presence of resistance genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}, virulence *cps*, *mrkD* and *fimH*, and the ability of biofilm formation in 9 isolates of *Klebsiella pneumoniae* multidrug-resistant in the absence and presence antibiotics. Biofilm formation on the surface of catheters in the presence and absence of β -lactam antibiotics (cefotaxime and ceftazidime) and the aminoglycoside amikacin, was confirmed by Scanning Electron Microscopy (SEM). All isolates were resistant to cefotaxime and ceftazidime antibiotics, only 3 were resistant to amikacin by broth macrodilution. Genotyping by ERIC-PCR showed distinct genetic profiles for the nine isolates. In determining the presence of genes by conventional PCR, only seven of the nine isolates were positive for the resistance genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} or *bla*_{KPC} and six for *bla*_{CTX-M}. All isolates were positive for virulence genes *cps* and *mrkD* and six for *fimH*. SEM has shown adherent cells, forming biofilms on all isolates in the absence of antibiotics. Some isolates produced biofilm when subjected to antibiotics tested. On 2 isolates the ability to form biofilm was favored by antibiotics. Although the isolates were resistant to antibiotics, a decreased number of adhered and biofilm formation has been observed for isolated cells of *K. pneumoniae* producers for different β -lactamases and virulence factors, which showed different behavior in relation to biofilm formation, depending on the isolate and the antibiotic, which may inhibit or promote biofilm formation. The increasing incidence of isolates of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems and other classes of beta-lactam antibiotics in infections related to health care, has been widely related to production of β -lactamase. The use of invasive devices such as catheters, in hospitalized patients may favor colonization of such devices by different bacterial species, leading to formation of biofilms, which may worsen the patient's clinical status impairing the treatment efficacy.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, biofilm, cefotaxime, ceftazidime, amikacin

INTRODUCTION

Infections caused by *Klebsiella pneumoniae* isolated with phenotypic resistance pattern to cephalosporins and carbapenems third has broad correlation with the presence of ESBL (Extended Spectrum β -lactamase) type SHV, TEM and CTX -M and more recently with carbapenemase type KPC. In addition, other carbapenemases type VIM, IMP and SPM have been described in *K. pneumoniae* isolated obtained from infections related to health care (IRAs). [1-4]

The pathogenicity of *K. pneumoniae* can be increased due to the presence of different virulence factors, including the production of polysaccharide capsule that protects against phagocytosis and production of non-fimbrial and fimbrial adhesins, facilitating bacterial adherence to surfaces of specific tissue and abiotic surfaces such as catheters, contributing to the formation of biofilm in these bacterial species [5-6].

The use of invasive medical devices favors the formation of biofilm by providing a surface for the bacterial adhesins to settle [6]. *K. pneumoniae* has been reported to cause infections related to medical devices and production of bacterial biofilm *K. pneumonia* (NELSON et al., 2003; HOCEVAR SN, EDWARDS JR, HORAN TC, MORRELL GC, IWAMOTO M, 2012; SINGHAI et al., 2012).

In vitro studies have pointed out exposure to sub-minimal inhibitory (sub-MICs) concentrations of moxifloxacin and colistin may be associated with a decrease in the ability of biofilm formation on polystyrene surfaces, which can lead to greater susceptibility to the system immune and antibiotic therapy, suggesting that these may not kill the bacteria or cause morphological changes, but affect the properties associated with bacterial virulence [10]

Given the high resistance of bacterial isolates from different species and the search for an appropriate therapy, antimicrobials in combination have been alternatively used for the treatment of infections caused by multidrug resistant isolates (MDR) [11].

Due to the importance of therapy with β -lactams and aminoglycosides in cases of infections with isolates of *K. pneumoniae* MDR and the strong association of bacterial biofilms in IRAs, this study aimed to determine the ability of isolates of *K. pneumoniae* harboring different resistance genes and virulence, to form biofilm when submitted or not to β -lactam antibiotics and aminoglycoside amikacin alone and in combination with ceftazidime, aiming to determine the interference of these antibiotics in biofilm formation by isolates of *K. pneumoniae*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates

For this study nine isolates of *K. pneumoniae* were analyzed, which were identified and tested for their susceptibility using the automated VITEK $\text{\textcircled{R}}$ 2 system (bioMérieux). The isolates were obtained from patients admitted to public hospitals in Recife-Pernambuco-Brazil, in the years of 2011 and 2012.

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC of all isolates front cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ) and amikacin (AMC) was confirmed manually by the broth macrodilution test, according to the standards and interpretive criteria of the CLSI (2013). Reference strains of *K. pneumoniae* ATCC 700603 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were used as quality control.

DNA extraction and PCR for detection of resistance genes and virulence

The extraction of total DNA was performed using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) kit according to manufacturer's instructions. The amplification reactions for the genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{KPC}*, *cps*, *fimH* and *mrkD* were performed using a total volume of 25 µl per tube, comprising: 1 µl of genomic at 20 ng / uL, 1 U of the enzyme DNA Taq DNA polymerase (Promega) in 200 mM deoxyribonucleotide triphosphate (GeHealthcare), 1.5 mM MgCl₂, 10 pmol primers, and 2.5 µl buffer (10x). Amplifications were performed in a thermocycler (Genepro, Bioer) using the following cycling: 5 minutes 96 °C for initial denaturation, followed by 35 cycles, each cycle consisting of 1 minute at 96 °C for denaturation, 1 minute at specific temperature for each primer (Table 1) and 1 minute at 72 °C for extension. After 35 cycles a final elongation step of 10 minutes was held at 72 °C. The amplification products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel in TBE buffer

ERIC-PCR

The analysis of genetic similarity was performed by ERIC-PCR method using the ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3') primers and ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') [12]. The reactions were prepared with a 25 µl volume containing 2.5 mM MgCl₂, 50 mM of each dNTP, 0.3 mM of each primer, 5 µl of the sample DNA and 1.5 U Taq DNA polymerase (Promega). Amplifications were performed with 30 cycles with an initial denaturation at 94°C for 1 second, annealing at 52°C for 10 seconds, and extension at 72°C for 35 seconds, followed by a final extension at 72°C for 4 minutes (CABRAL et al., 2012). The amplification products were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gel in TBE buffer for later photodocumented construction of a dendrogram using the program PAST.

Biofilm formation

Assessment of biofilm formation was performed in all 9 isolates of *K. pneumoniae* according to the methodology described by Pour et al. (2011) with modifications. To determine the ability of isolates to form biofilm in BHI broth and Mueller Hinton separately, one ml of culture bacterial growth was transferred to flasks containing a piece catheter approximately 50 cm and 1 ml of the medium for incubation for 72 hours at 37 °C. under two conditions: without stirring under rotation of 200 rpm [10].

To analyze the plaque forming ability of the isolated when subjected to ceftazidime and cefotaxime separately, one ml of bacterial growt containing 1.5 x 10⁸ cells were transferred to flasks containing antibiotics, one piece catheter approximately 50 cm and 1 ml of Mueller Hinton broth. Another test was conducted with three strains of *K. pneumoniae* (K652, K786, K1) resistants to amikacin, which were also subjected to this antibiotic alone and in combination with ceftazidime. The concentrations of antibiotics used were chosen to simulate clinically relevant concentrations of ceftazidime (27 mg / ml), cefotaxime (102 mg / ml) and amikacin (4 mg / ml) (ADAMIS et al., 2004; AHSMAN et al., 2010; HIRSCH EB, GUO B, CHANG KT, CAO H,

LEDESMA KR, SINGH M, 2012). The strains were incubated at 37 ° C for 72 hours under rotation of 200 rpm.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

The analysis of the ability of the isolated *K. pneumoniae* to form biofilms under the conditions described above was performed by SEM. After bacterial growth catheters were washed, fixed, post-fixed, dehydrated and brought to critical point drying and mounting of the material on metallic substrates. Then metalization and visualization of samples was performed in a scanning electron microscope JEOL JSM-5600 LV.

RESULTS

Antimicrobial susceptibility

The broth macrodilution test has shown that all isolates of *K. pneumoniae* were resistance or intermediate resistance to cefotaxime and ceftazidime, and only three were resistant or intermediate resistant to amikacin (Table 2).

Presence of virulence and resistance genes

All the isolates of *K. pneumoniae* present the genetic operon responsible for the production of CPS (*cps*), and the encoding gene the type 3 fimbriae (*mrkD*). Among the nine isolates tested, six had the *fimH* gene involved with the production of type 1 fimbriae. Additionally, seven of the nine isolates were positive for the resistant gene *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* or six *bla_{KPC}* (Table 2). The K952, K483 K38727 isolates simultaneously presented all resistance and virulence genes.

Genotyping by pela ERIC-PCR

Isolates of *K. pneumoniae* were grouped into four genetic groups, unrelated, presenting close similarity between 56-72% (Figure 1). In the first group, the K3300 and K3294 isolates present strong genetic similarity (96%), differing in only one band. In the second group three isolates were included; two genetic profile (K1 and K39915) showed 96% similarity and the other (K38727) present 88%. In the third group, the K483 and K952 isolates had 4 different bands, with 80% similarity. The K652 and K786 isolates formed a fourth group with low genetic relationship to each other differing by five bands (64% similarity).

Biofilm formation

The isolate control cells from K483 *K. pneumoniae* had become elongated, presumably due to the stress caused by shaking, as well as their adherence with little extracellular matrix. After ceftazidime submission numerous adherent cells and arranged in layers can be observed, producing intense amount of extracellular matrix (ECM) indicating biofilm formation. The submission of this isolate cefotaxime, amikacin, ceftazidime and combined caused inhibition of biofilm formation when compared to ceftazidime alone, where the cells had adhered, the surface of the catheter, producing, however, little extracellular matrix (figure 2).

The isolated K38727 *K. pneumoniae* biofilm formed without submission to antibiotics, few cells adhered well as little MEC. When subjected to ceftazidima and cefotaxime antibiotics, we could observe cell adhesion and layered arrangement producing intense amount of ECM, especially when subjected to ceftazidime (Figure 3).

The isolated K952 *K. pneumoniae* in control conditions, biofilm formed with large amounts of ECM and cells adhered to the surface of the catheter. Even when subjected to ceftazidime, the isolate was able to form

biofilm, with less MEC and number of adherent cells. Submission of this isolate cefotaxime inhibited adhesion of bacterial cells to the surface of the catheter and thus biofilm formation.

The isolated K3294 in control conditions formed biofilm with large numbers of adherent cells and MEC. The submission ceftazidime strongly decreased cell adhesion to the surface of the catheter. Non adherent cells or biofilm formation were identified after submission to cefotaxime (Figure 3).

The isolate K3300, presented biofilm formation in the absence of antibiotics. When subjected to ceftazidime, the cells showed initial stage of biofilm formation, characterized by strong cell adhesion to the surface of the catheter and low amount of MEC. When subjected to cefotaxime, although a large number of cells have adhered to it, no MEC or biofilm formation (Figure 4).

The KPC1 isolated in the absence of antibiotics, few adhered cells was observed, showing initial stage of biofilm formation with even scant amount of MEC. When subjected ceftazidime, cefotaxime, ceftazidime amikacin, amikacin and combined, a significant increase in the number of adhered cells and ECM occurring inducing the formation of biofilms (Figure 5).

The K39915, K652 and K784 isolates showed biofilm formation only when subjected to control conditions without antibiotics.

DISCUSSION

Biofilm formation and persistence has profound implications for the patient, as microorganisms that grow as fast as biofilms are significantly less susceptible to antibiotics and host defenses than planktonic forms of the same microorganisms. Antimicrobial resistance in bacteria is also a major global health problem, and β - lactamases production of a major mechanism of resistance. The virulence mechanisms produced by *K. pneumoniae* contribute to its pathogenicity [17].

Most cefotaxime and ceftazidime antibiotics MICs from the analyzed isolates was high, in addition β -lactamases TEM , SHV , CTX and KPC were found . These enzymes have been frequently detected in isolates of *K. pneumoniae* related to resistance to ceftazidime and cefotaxime (LAL et al., 2007; LOPES et al., 2010; PFEIFER et al., 2010; CABRAL et al., 2012), which is in accordance with the results found.

The presence of the genes for polysaccharide capsule and fimbriae type 3 has been verified in all isolates, and the order H gene in seven of the nine isolates. These virulence mechanisms are common in isolates of *K. pneumoniae* [21] and seem to favor the formation of biofilm, as they are important adhesion [22-24] structures. In our study we found that isolates that were able to adhere and form biofilm on the surface of the catheters had *mrkD* and *cps* genes.

Although some isolates analyzed in this study show similar susceptibility profiles, the presence of these resistance genes and virulence genotyping by ERIC - PCR showed 9 distinct genetic profiles. Sizes of bands and different profiles in isolates from the same species have been reported previously (MEACHAM et al., 2003; CABRAL et al., 2012; BARUS et al., 2013).

In our study, we verify the ability of isolates to form biofilm, even when subjected to sub - MICs of cefotaxime, ceftazidime and amikacin and ceftazidime alone associated with amikacin. A study of isolates of *K. pneumoniae* that verify the Minimum Biofilm Elimination Concentration (MBEC) gentamicin and colistin antibiotics, showed that the cells present in the biofilm were not more resistant to gentamicin than planktonic

cells, as compared to colistin is formed biofilms showed 2 - 3 times more resistant [27] , thus showing that antibiotics can interfere with biofilm formation .

In this study, cefotaxime , ceftazidime , amikacin, and ceftazidime associated amikacin increase capacity for biofilm formation by strain K1 . Induction of biofilm formation by ceftazidime has been reported in *Proteus mirabilis* isolates [28] and cefotaxime in isolates of *Salmonella enteric* [29]. This induction was also isolated in this study K38727 compared to cefotaxime and ceftazidime especially when subjected to ceftazidima. This shows that the induction antibiotics can act not only to kill bacteria but also as signaling molecules that can regulate microbial communities [30].

The in vivo efficacy of the combination of ceftazidime and amikacin against *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing endocarditis in rabbits [31] , was demonstrated with the significant decrease in the number of colonies and a higher percentage of animal survival . Dales et al . (2006) investigated the in vitro efficacy of the combination of ceftazidime with amikacin against biofilms formed by 14% of isolates of *Burkholderia cepacia* from patients with cystic fibrosis pulmonary exacerbation [32]. The reduction in biofilm formation due to Ceftazidime sub- MICs of antibiotics and amikacin was also observed by Di Martino and Bret (2004). In the present study, both the combination of ceftazidime with amikacin , cefotaxime as used alone were more effective when compared to ceftazidime , isolated against K483 which showed all the resistance genes and virulence surveyed [33].

According Wojnicz and Tichaczek - Goska (2013) , sub- MICs of amikacin can be useful in the treatment of infections associated with biofilm formation in *Escherichia coli*. In another study, decreased penetration of cefotaxime and oxacillin has been detected, achieving similar result to amikacin and ciprofloxacin on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* [34] . Other authors suggest that amikacin can inhibit virulence mechanisms [35]. These studies may explain the possible action of amikacin in isolated K483.

The 786 does not have isolated the genes *bla*_{CTX-M} , *bla*_{SHV} or *bla*_{TEM} and was less resistant to ceftazidime, as well as isolated K39915 not have the *bla*_{CT-M} gene, both were not positive for *fimH* gene, which is reported in the literature to be associated with biofilm formation, since this is important for cell adhesion gene (SCHEMBRI et al., 2005; SAHLY et al., 2008a; STAHLHUT et al., 2012). K652 isolated in the VHS and TEM enzymes were not found , but still had higher MICs probably due to the presence of the genes *bla*_{CTX-M} and *bla*_{KPC}. Even with high levels of MICs and the presence of *mrkD* and *cps* genes *fimH* this isolate was not able to form biofilms when subjected to antibiotics.

The isolated K3294 which did not carry the genes *fimH* and *bla*_{KPC}, that formed biofilm on control conditions, when subjected to ceftazidime had biofilm formation inhibited but cells showed an earlier stage of biofilm formation when subjected to cefotaxime. As for the K3300 isolate, which did not carry the gene *bla*_{KPC} but *fimH*, cells showed an earlier stage of biofilm formation when subjected to ceftazidime and did not form biofilm when subjected to cefotaxime. These results suggest that the presence of *fimH* gene in isolated K3300 wasn't important to cell adhesion, since the two isolates showed similar MICs.

The isolated K952 which carry every concerning resistance and virulence genes, present high MICs, but the antibiotic cefotaxime was able to inhibit cell adhesion and biofilm formation. A study by Hennequin et al. (2012) also found a reduction of biofilm formed by insulated *K. pneumoniae* when subjected to sub - MICs of cefotaxime [5].

A study by Bagge et al. 2004 showed that antibiotic induced biofilm formation by isolates of *P. aeruginosa* and expression of β -lactamase, so the evaluation of the ability to form biofilms clinical isolates from clinical must be included in order to improve antibiotic performed laboratories [38].

Although antibiotic-resistant isolates were tested in this study it was found that some isolates had decreased until inhibition biofilm formation when subjected to antibiotics. Has been described by other authors that the antibiotic cannot eliminate the biofilm, but can act on it causing changes in bacterial cells (POMPILIO et al., 2010; POUR et al., 2011)..

Our results show that the strains of *K. pneumoniae* multidrug - resistant patients with different virulence and resistance genes showed different behavior in relation to biofilm formation, depending on the strain and the antibiotic to which they were submitted, which may inhibit or induce the formation of biofilm.

Table 1. Primers used for polymerase chain reaction to detect genes analyzed by this study.

Gene	Primer (5'-3')	Reference	A.N. ^(a) (°C)
<i>bla</i> _{TEM}	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA GACAGTTACCAATGCTTAATC	(RASHEED et al., 1997)	66
<i>bla</i> _{KPC}	TGTCACTGTATCGCCGTC- CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	(YIGIT et al., 2001)	68
<i>bla</i> _{CTX-M}	SCSATGTGCAGYACCAGTAA CCGCRATATGRTTGGTGGTG	(SALADIN et al., 2002)	63
<i>bla</i> _{SHV}	GGTTATGCGTTATATTCGCC-3', TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3'	(RASHEED et al., 1997)	64
<i>cps</i>	TCCCAATTGTGACCGAAATC GCTCGCGGCACCAGCTGA	(HENNEQUIN; FORESTIER, 2007)	63
<i>fimH</i>	CACGCAAGGCACCATTC GCTCAGAATCAACATCGGTAAC	(STAHLHUT et al., 2009)	63
<i>mrkD</i>	CCACCAACTATTCCCTCGAA ATGGAACCCACATCGACATT	(HENNEQUIN; FORESTIER, 2007)	59

^(a) Annealing temperature.Table 2. MICs from isolates of *K. pneumoniae* for antibiotics cefotaxime, ceftazidime and amikacin and virulence and resistance genes detected by this study.

Isolate ^a	MIC (µg/ml)			Gene						
	CTX	CAZ	AMC	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>mrkD</i>	<i>cps</i>	<i>fimH</i>
K786	128 ^r	16 ^r	1 ^s	-	-	+	-	+	+	-
K652	>256 ^r	>256 ^r	6 ^r	-	+	+	-	+	+	+
K952	>256 ^r	>256 ^r	0,5 ^s	+	+	+	+	+	+	+
K39915	>256 ^r	128 ^r	2 ^s	+	-	+	+	+	+	-
K483	64 ^r	>256 ^r	8 ^r	+	+	+	+	+	+	+
K38727	>256 ^r	128 ^r	4 ^s	+	+	+	+	+	+	+
K 1	64 ^r	16 ^r	>64 ^r	+	-	+	+	+	+	+
K 3300	>256 ^r	128 ^r	1 ^s	+	+	-	+	+	+	+
K 3294	>256 ^r	>256 ^r	2 ^s	+	+	-	+	+	+	-

^a Isolates identification. ^r Resistant. ^s Susceptible.

CTX - cefotaxime; CAZ - ceftazidime; AMC - amikacin.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima dos isolados de *K. pneumoniae* frente aos antibióticos cefotaxima, ceftazidima e amicacina e genes de resistência e virulência detectados neste estudo.

Isolado ^a	Perfil da ERIC-PCR	CIM (μg/ml)			Gene						
		CTX	CAZ	AMC	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>mrkD</i>	<i>cps</i>	<i>fimH</i>
K786	G4	128 ^r	16 ^r	1 ^s	-	-	+	-	+	+	-
K652	G4	>256 ^r	>256 ^r	6 ^r	-	+	+	-	+	+	+
K952	G3	>256 ^r	>256 ^r	0,5 ^s	+	+	+	+	+	+	+
K39915	G2	>256 ^r	128 ^r	2 ^s	+	-	+	+	+	+	-
K483	G3	64 ^r	>256 ^r	8 ^r	+	+	+	+	+	+	+
K38727	G2	>256 ^r	128 ^r	4 ^s	+	+	+	+	+	+	+
K1	G2	64 ^r	16 ^r	>64 ^r	+	-	+	+	+	+	+
K 3300	G1	>256 ^r	128 ^r	1 ^s	+	+	-	+	+	+	+
K3294	G1	>256 ^r	>256 ^r	2 ^s	+	+	-	+	+	+	-

^a Identificação dos isolados. ^r Resistente. ^s Sensível.

Siglas: CIM - Concentração Inibitória Mínima; CTX - cefotaxima; CAZ - ceftazidima; AMC - amicacina.

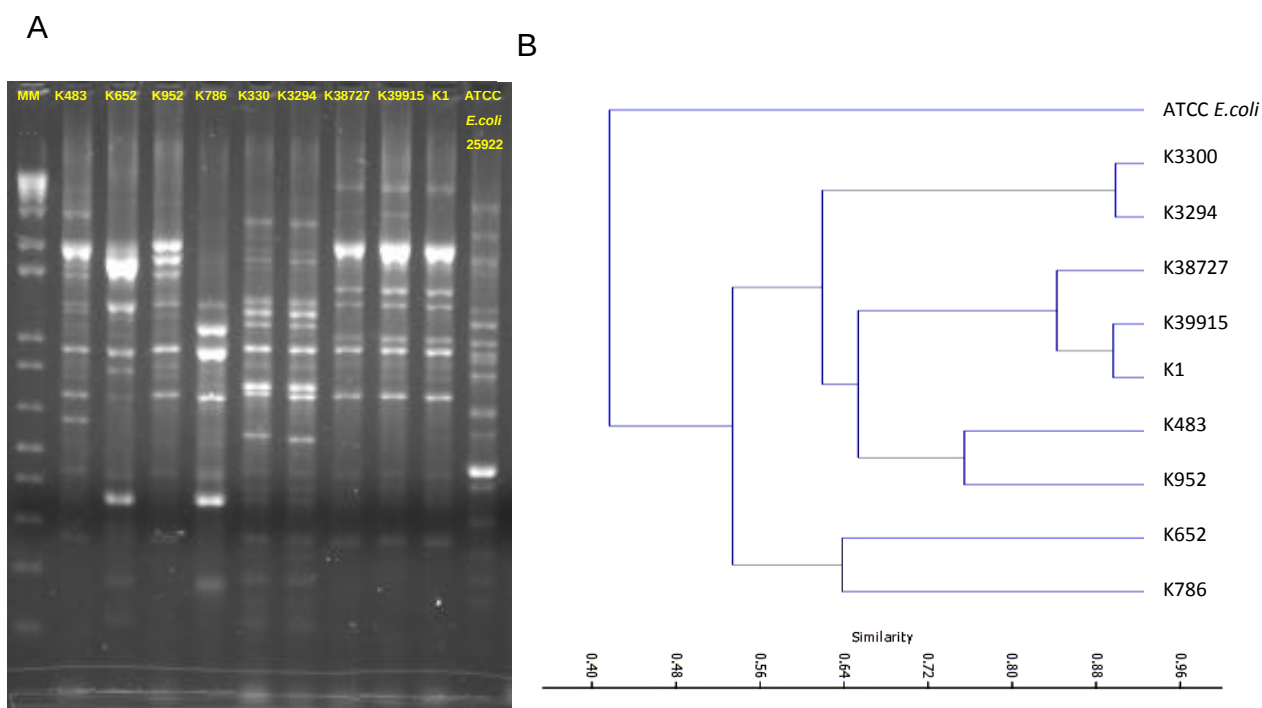


Fig 1. Genotyping by ERIC-PCR. **A-** Agarose gel (1,5%) electrophoresis of amplification products. Line 1: MM- Molecular weight marker (100 pb); lines 2 a 10, isolates of *K. pneumoniae*; line 12: ATCC *E.coli* 25922. **B-** Dendrogram of genetic similarity, generated by software PAST.

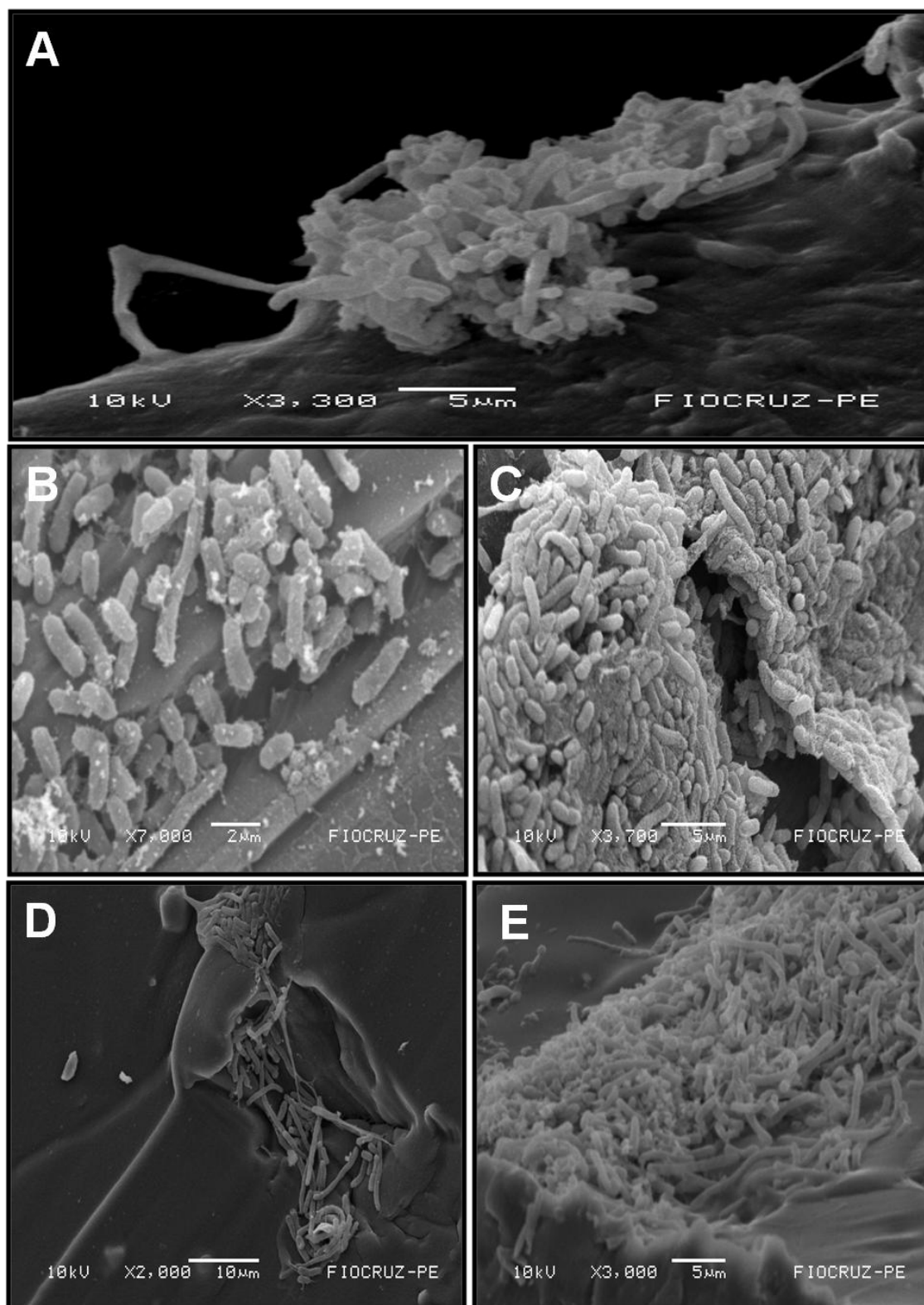


Fig 2 (A-E): Electron micrographs of scanning electron microscopy of isolated K483. A-Cells control (no antibiotic), elongated, strongly adhered with loads of CEM. Cells undergoing B-AMC (4 μg/ml), with a small amount of CEM. C-Cells submitted to CAZ (27 μg/ml), with loads of ECM and organization of bacterial biofilms. D- Cells submitted to AMC (4 μg/ml) and CAZ (27 μg/ml), cells adhered to observe a small amount of ECM. E- Cells submitted to CTX (102 μg/ml), with cells attached with a small amount of CEM.

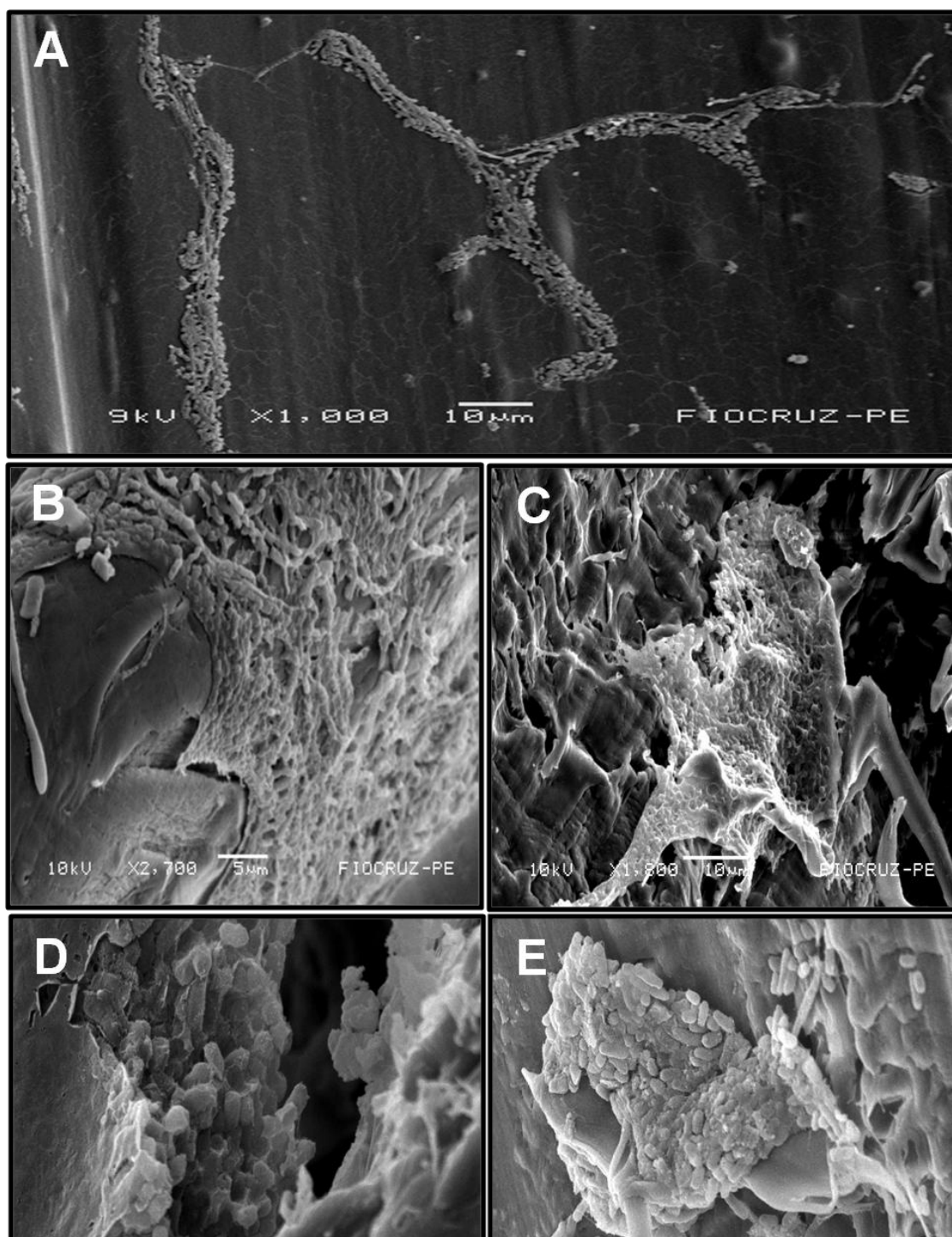


Fig 3 (A-E): Scanning electron micrographs of K952 and K38727 isolates. A- Cells of isolate K38727 control (without antibiotic), forming biofilm showing little amount of ECM. B- cells from K38727 isolate submitted to CAZ (27 µg /ml) arranged in layers, with intense amount of ECM. C-Cells K38727 isolate submitted to CTX (102 µg /ml) arranged in layers, with intense amount of ECM. D-Cells of K952 isolated control (without antibiotic), forming biofilm with loads of ECM. E- Cells from K952 isolate submitted to CAZ (27 µg /ml),showing little ECM ..

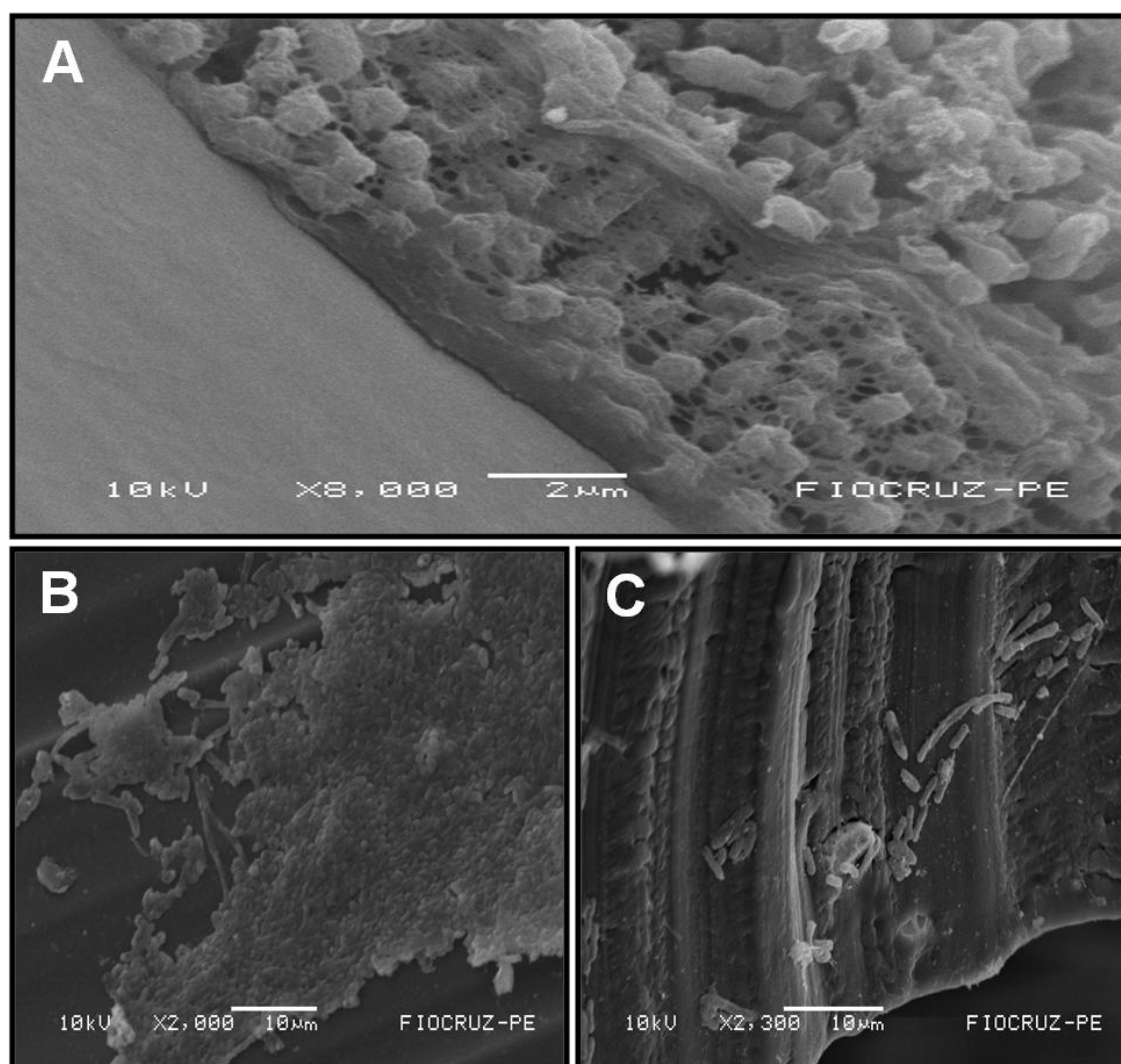


Fig 4 (A-C): Electron micrographs of scanning electron microscopy of K3294 isolate. A- Cells control (without antibiotic), forming biofilm with loads of ECM. B- cells submitted to CTX (102 μg /ml) in the initial stages of biofilm formation. C- Cells submitted to CAZ (32 μg /ml) attached but without ECM.

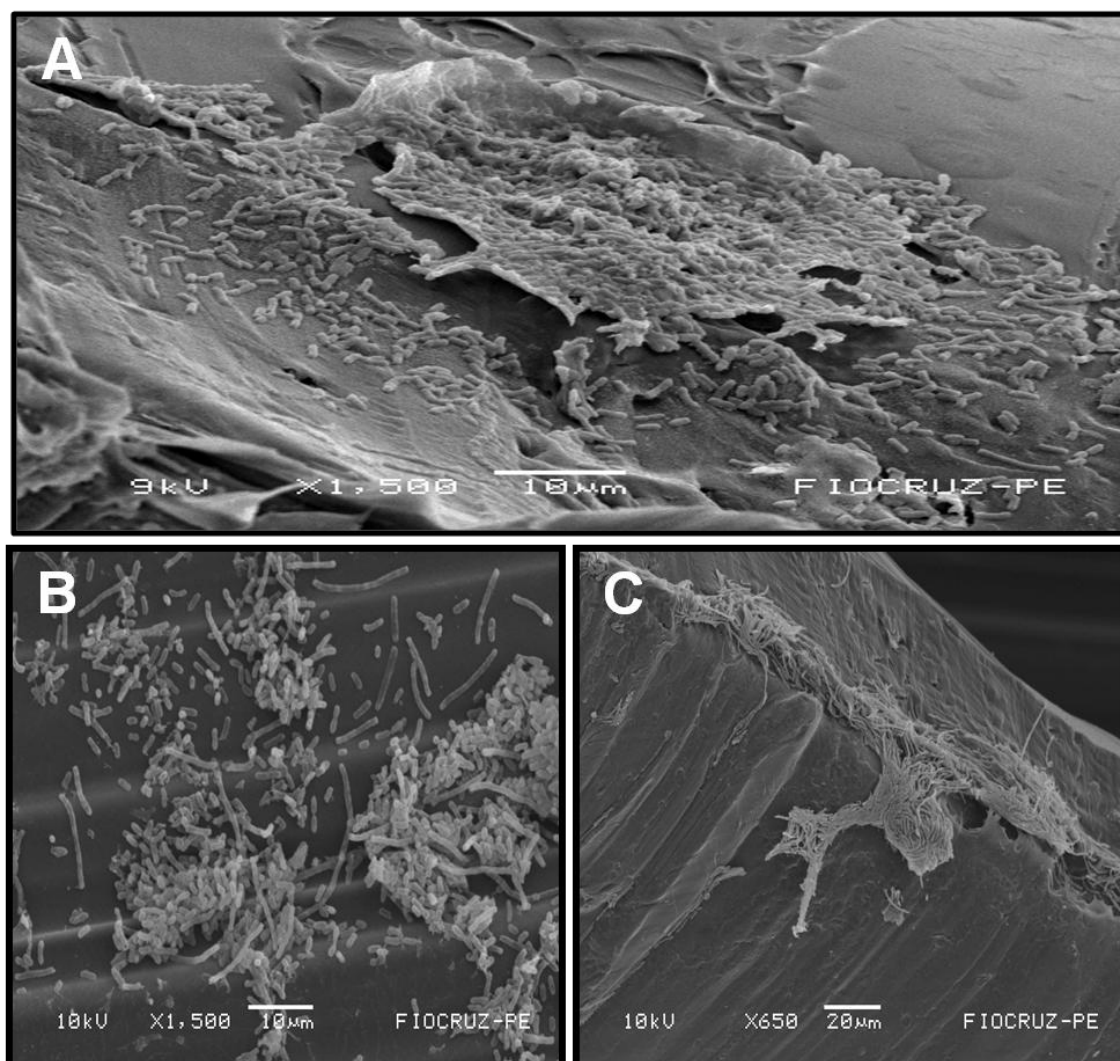


Fig 5 (A-C): Electron micrographs of scanning electron microscopy of K3300 isolate. A- Cells control, forming biofilm. B- cells submitted to CTX (102 µg /ml), but without adhering the ECM. C- cells submitted to CAZ (32 µg /ml) in the initial stage of biofilm formation.

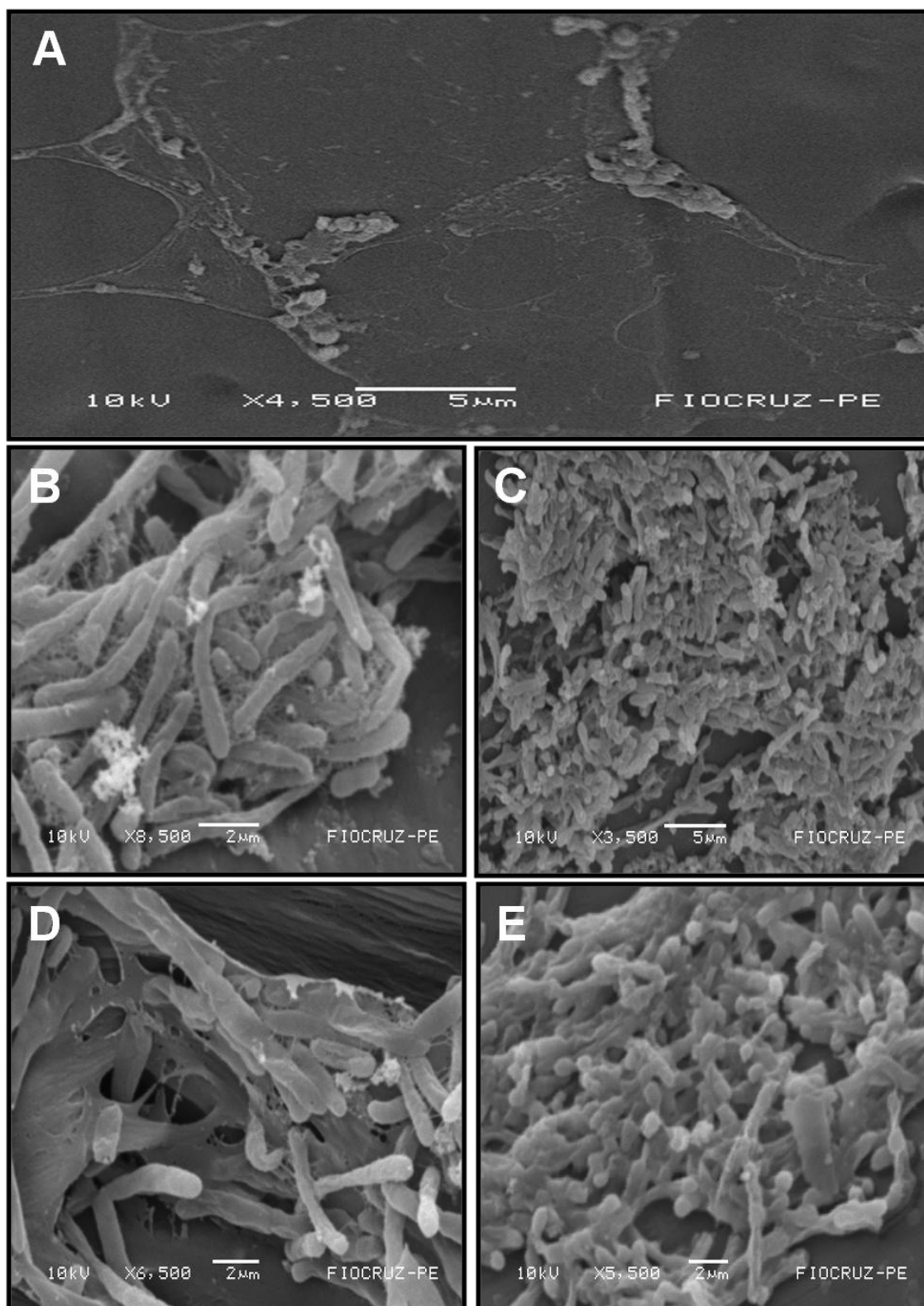


Fig 6 (A-E): Electron micrographs of scanning electron microscopy of K1 isolate. A- Cells control (no antibiotic) in the initial stage of biofilm formation. B- Cells submitted to AMC (4 mg / ml), forming biofilm. C- Cells submitted to CAZ (27 µg /ml), forming biofilm. D- Cells submitted to AMC (4 µg /ml) and CAZ (27 µg /ml) and biofilm-forming cells submitted to CTX (102 µg /ml), forming biofilm.

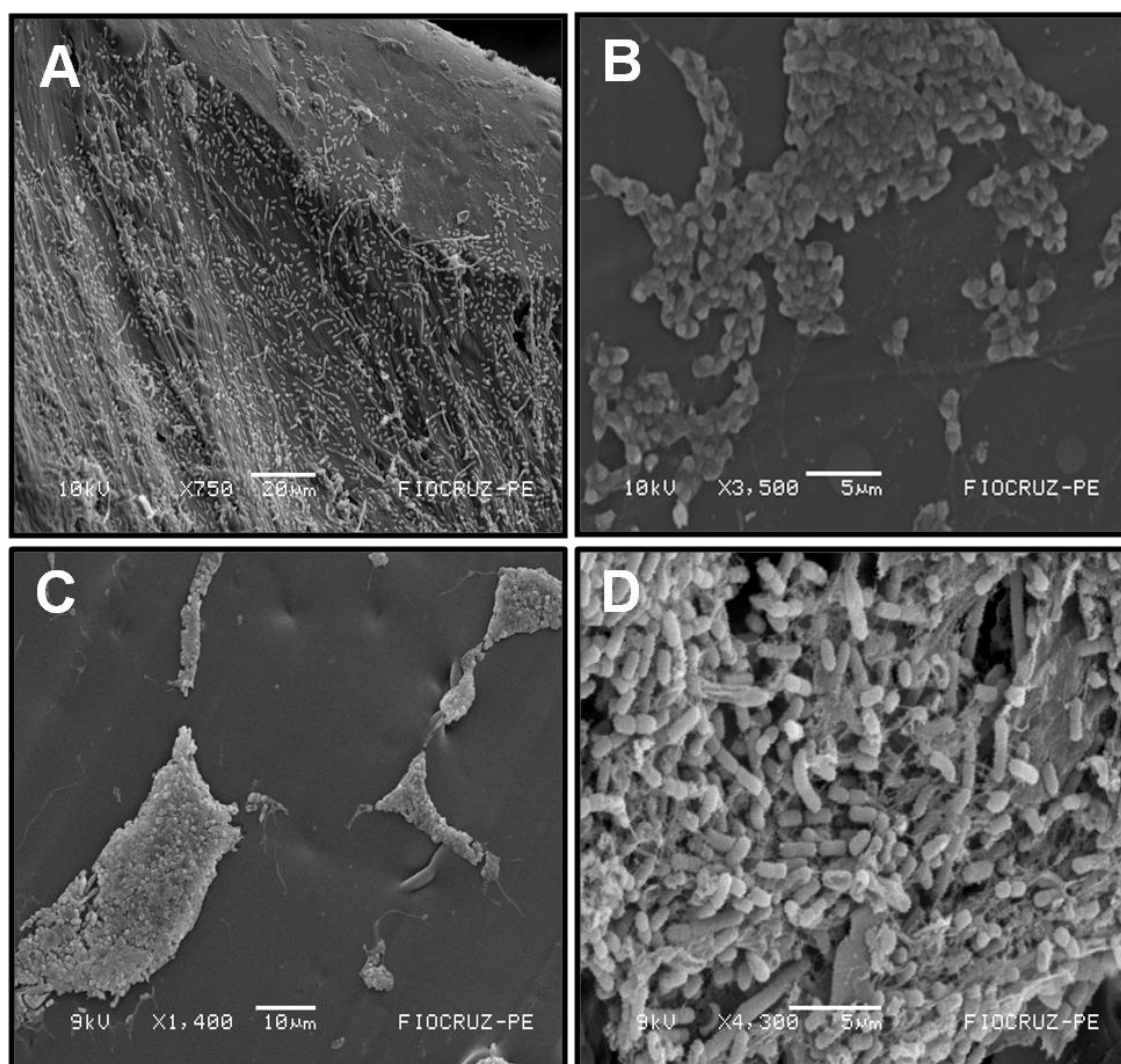


Fig 7 (A-D): Electron micrographs of K39915, K652 and K786 isolates controls (without antibiotic). A- B-Cells of K39915 isolate adhered. C-cells of K652 isolate adhered. D-cells of K786 isolate adhered.

References

1. PATERSON, D. L.; ROSSI, F.; BAQUERO, F.; et al. In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 965–73, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15849262>>. Acesso em: 2/11/2012.
2. BRADFORD. 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89009/>>. .
3. Chong, Y., Ito, Y., & Kamimura, T. (2011). Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 11(7), 1499–504. doi:10.1016/j.meegid.2011.06.001
4. STEINMANN, J.; KAASE, M.; GATERMANN, S.; et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. **Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 16, n. 33, p. 1–6, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21871227>>. .
5. QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–58, table of contents, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1932750&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3/11/2012.
6. STAHLHUT, S. G.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A.; REISNER, A. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 65, n. 2, p. 350–9, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3410544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2/11/2012.
7. HENNEQUIN, C.; AUMERAN, C.; ROBIN, F.; TRAORE, O.; FORESTIER, C. Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2123–30, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22577106>>. Acesso em: 27/10/2012.
8. HOCEVAR SN, EDWARDS JR, HORAN TC, MORRELL GC, IWAMOTO M, L. F. Device-associated infections among neonatal intensive care unit patients : incidence and associated pathogens reported to the National Healthcare Safety Network , 2006-2008 . **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 33, n. 12, p. 1200–1206, 2012.
9. NELSON, E. C.; SEGAL, H.; ELISHA, B. G. Outer membrane protein alterations and blaTEM-1 variants: their role in beta-lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 899–903, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613957>>. Acesso em: 16/2/2014
10. SINGHAI, M.; MALIK, A.; SHAHID, M.; MALIK, M. A.; GOYAL, R. A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. **Journal of global infectious diseases**, v. 4, n. 4, p. 193–8, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3543538&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14/1/2014.
11. POMPILIO, A; CATAVITELLO, C.; PICCIANI, C.; et al. Subinhibitory concentrations of moxifloxacin decrease adhesion and biofilm formation of *Stenotrophomonas maltophilia* from cystic fibrosis. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. Pt 1, p. 76–81, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19762476>>. Acesso em: 12/2/2014.
12. POUR, N. K.; DUSANE, D. H.; DHAKEPHALKAR, P. K.; et al. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 62, n. 3, p. 328–38, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21569125>>. Acesso em: 21/11/2012.
13. PAUL, M.; LADOR, A.; LEIBOVICI, L. Beta-lactam antibiotic monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis . PubMed Commons. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 25, n. 1, p. 1–2, 2006.

14. DUAN, H.; CHAI, T.; LIU, J.; et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v. 109, n. 5, p. 511–7, 2009. Elsevier. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19349045>>. Acesso em: 28/1/2013.
15. CABRAL, A. B.; CÁSSIA, R. DE; MELO, D. A.; AMÉLIA, M.; MACIEL, V. Major Article among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife , Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 572–578, 2012.
16. ADAMIS, G.; PAPAIOANNOU, M. G.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; et al. Pharmacokinetic interactions of ceftazidime, imipenem and aztreonam with amikacin in healthy volunteers. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 2, p. 144–9, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15013039>>. Acesso em: 29/1/2013.
17. AHSMAN, M. J.; WILDSCHUT, E. D.; TIBBOEL, D.; MATHOT, R. A. Pharmacokinetics of cefotaxime and desacetylcefotaxime in infants during extracorporeal membrane oxygenation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 1734–41, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2863660&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8/1/2014.
18. HIRSCH EB, GUO B, CHANG KT, CAO H, LEDESMA KR, SINGH M, T. V. Assessment of antimicrobial combinations for *Klebsiella pneumoniae* PubMed Commons. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 5, p. 786–793, 2012.
19. BRYERS, J. D. Medical biofilms. **Biotechnol Bioeng**, v. 100, n. 1, p. 1–18, 2008.
20. LAL, P.; KAPIL, A.; DAS, B. K.; SOOD, S. Occurrence of TEM & SHV gene in extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella* sp. isolated from a tertiary care hospital. **The Indian journal of medical research**, v. 125, n. 2, p. 173–8, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17431288>>. .
21. LOPES, A. C. S.; VERAS, D. L.; LIMA, A. M. S.; MELO, R. D. C. A.; AYALA, J. bla(CTX-M-2) and bla(CTX-M-28) extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 163–7, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20428675>>. .
22. PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 300, n. 6, p. 371–9, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20537585>>. Acesso em: 27/10/2012.
23. PODSCHUN, R.; FISCHER, A; ULLMAN, U. Expression of putative virulence factors by clinical isolates of *Klebsiella planticola*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 115–9, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10670561>>. .
24. BALESTRINO, D.; GHIGO, J.-M.; CHARBONNEL, N.; HAAGENSEN, J. A J.; FORESTIER, C. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 3, p. 685–701, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18237304>>. Acesso em: 3/11/2012.
25. EVRARD, B.; BALESTRINO, D.; DOSGILBERT, A; et al. Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 1, p. 210–9, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2798207&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23/11/2012.
26. BELLIFA, S.; HASSAINE, H.; BALESTRINO, D.; et al. Evaluation of biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the University Hospital of Tlemcen , Algeria. , v. 7, n. 49, p. 5558–5564, 2013.
27. SCHEMBRI, M. A.; BLOM, J.; KROGFELT, K. A.; KLEMM, P. Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. **American Society for Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 4626–4633, 2005.
28. SAHLY, H.; PODSCHUN, R.; OELSCHLAEGER, T. A; et al. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 12, p. 6744–9, 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=97775&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .
29. MEACHAM, K. J.; ZHANG, L.; FOXMAN, B.; et al. Evaluation of Genotyping Large Numbers of *Escherichia coli* Isolates by Enterobacterial Repetitive Intergenic Evaluation of Genotyping Large Numbers of *Escherichia coli* Isolates by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5224–5226, 2003.

30. BARUS, T.; HANJAYA, I.; SADELI, J.; et al. Genetic Diversity of *Klebsiella* spp. Isolated from Tempe based on Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR). **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 20, n. 4, p. 171–176, 2013. Disponível em: <<http://journal.ipb.ac.id/index.php/hayati/article/view/7320>>. Acesso em: 12/2/2014.
31. NAPARSTEK, L.; CARMELI, Y.; NAVON-VENEZIA, S.; BANIN, E. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1–8, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24408988>>. Acesso em: 30/1/2014.
32. KWIECIŃSKA-PIRÓG, J.; BOGIEL, T.; GOSPODAREK, E. Effects of ceftazidime and ciprofloxacin on biofilm formation in *Proteus mirabilis* rods. **The Journal of antibiotics**, v. 66, n. 10, p. 593–7, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23801185>>. Acesso em: 21/1/2014.
33. MAJTÁN, J.; MAJTÁNOVÁ, L.; XU, M.; MAJTÁN, V. In vitro effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation by clinical strains of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* isolated in Slovakia. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 5, p. 1294–301, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18028358>>. Acesso em: 16/2/2014.
34. BAGGE, N.; SCHUSTER, M.; HENTZER, M.; et al. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Exposed to Imipenem Exhibit Changes in Global Gene Expression and Beta-Lactamase and Alginate Production. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1175–1187, 2004.
35. STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S. C. J. DE. Salmonella biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 502–531, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911000615>>. Acesso em: 21/1/2014.
36. MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34–9, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166241>>. .
37. PEFANIS, A.; GIAMARELLOU, H.; KARAYIANNAKOS, P.; DONTA, I. Efficacy of Ceftazidime and Aztreonam Alone or in Combination with Amikacin in Experimental Left-Sided *Pseudomonas aeruginosa* Endocarditis. ,1993.
38. Dales L , Ferris W , Vandemheen K , Aaron SD Combination antibiotic susceptibility of biofilm-grown *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. *European Society of Clinical Microbiology*, v. 28, n. 10, p. 0–1, 2009.
39. BRET, L.; P, D. M. Effect of ceftazidime , amikacin and ciprofloxacin on biofilm formation by some enterobacterial clinical isolates. **Chemotherapy**, v. 50, n.5, p. 255–259, 2014.
40. WOJNICZ, D.; TICHACZEK-GOSKA, D. Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin, amikacin and colistin on biofilm formation and virulence factors of *Escherichia coli* planktonic and biofilm forms isolated from human urine. **Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 44, n. 1, p. 259–65, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3804207&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .
41. Singh R, Ray P, Das A, Sharma M (2010) Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 65:1955–8. doi: 10.1093/jac/dkq257
42. CIRIONI, O.; GHISELLI, R.; SILVESTRI, C.; et al. Effect of the combination of clarithromycin and amikacin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in an animal model of ureteral stent infection. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 6, p. 1318–23, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21406436>>. Acesso em: 16/2/2014.
43. RASHEED, J. K.; JAY, C.; METCHOCK, B.; et al. Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 647–53, 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=163766&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .
44. YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase , KPC-1 , from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.
45. SALADIN, M.; CAO, V. T. B.; LAMBERT, T.; et al. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. **FEMS microbiology letters**, v. 209, n. 2, p. 161–8, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007800>>. .
46. HENNEQUIN, C.; FORESTIER, C. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. **Research in Microbiology**, v. 158, n. 4, p. 339–47, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17446046>>. Acesso em: 25/10/2012.

47. STAHLHUT, S. G.; CHATTOPADHYAY, S.; STRUVE, C.; et al. Population variability of the FimH type 1 fimbrial adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 6, p. 1941–50, 2009. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2648365&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
Acesso em: 2/11/2012.