



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

***Klebsiella pneumoniae*: ESTUDO MOLECULAR DOS FATORES DE
RESISTÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL DA AÇÃO DE
ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS**

DYANA LEAL VERAS

RECIFE

FEVEREIRO, 2009

Dyana Leal Veras

***Klebsiella pneumoniae*: ESTUDO MOLECULAR DOS FATORES DE
RESISTÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL DA AÇÃO DE
ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS**

Dissertação submetida ao colegiado do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientadores:

Prof^a Dr^a Maria Amélia Vieira Maciel

Prof^a Dr^a Ana Catarina de Souza Lopes

Veras, Dyana Leal

Klebsiella pneumoniae: estudo molecular dos fatores de resistência e caracterização ultra-estrutural da ação de antibióticos β -lactâmicos / Dyana Leal Veras. – Recife : O Autor, 2009.

90 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2009.

Inclui bibliografia.

1. *Klebsiella pneumoniae* – Mecanismo de resistência. I. Título.

579.61
616.014

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2009-069

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

REITOR

Prof^o.: Amaro Henrique Pessoa Lins

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof^o.: Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^o.: José Tadeu Pinheiro

COORDENADOR DO PROGRAMA EM PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL

Prof^a.: Heloísa Ramos Lacerda de Melo

VICE - COORDENADOR DO PROGRAMA EM PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA TROPICAL

Prof^a.: Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

CORPO DOSCENTE

Prof^a.: Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Prof^a.: Elizabeth Malageño de Santana

Prof^a.: Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Prof^a.: Maria Amélia Vieira Maciel

Prof^a.: Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Prof^a.: Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Prof^o.: Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Prof^a.: Silva Maria de Lemos Hinrinsichsen

Prof^a.: Vera Magalhães da Silveira



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)¹

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA
DYANA LEAL VERAS

No dia 20 de fevereiro de 2009, às 08h00, na Sala Prof. Murillo La Greca no 3º. and do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), os Membros Doutores: Prof^ª. Dr^ª. Heloísa Ramos Lacerda de Melo (UFPE – Membro Interno), a Prof^ª. Dr^ª Janete Magali de Araújo (UFPE – Membro Externo) e o Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (CPqAM/FIOCRUZ – Membro Externo), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a mestranda DYANA LEAL VERAS sobre a sua Dissertação intitulada “ESTUDO MOLECULAR E ULTRA-ESTRUTURAL DE FATORES DE RESISTÊNCIA EM ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae*”. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof^ª. Dr^ª. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Prof^ª. Dr^ª. Janete Magali de Araújo

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Aprovado
Aprovado
Aprovado

Heloísa Ramos Lacerda de Melo
Prof^ª. Dr^ª Heloísa Ramos Lacerda de Melo
Janete Magali de Araújo
Prof^ª. Dr^ª Janete Magali de Araújo
Fábio André Brayner
Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

¹ Endereço: Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n – Bloco A – Térreo do Hospital das Clínicas da UFPE. CEP.: 50670-420, Cidade Universitária, Recife-PE. Fone/Fax: (081) 2126.8527. Sítio: <http://www.ufpe.br/ppgmedtrop>

DEDICO,

Primeiramente à Deus,

*Aos meus pais Amaury e Ana pelo amor, incentivo,
força e perseverança prestada em toda a minha
vida,*

*Aos meus irmãos Elizabeth, Amaury e Eliane pela
paciência, incentivo e apoio.*

*E ao meu esposo Guilherme, pela companhia,
essencial incentivo e sobretudo amor.*

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente à Deus por mim orientar e proteger sempre;
- Ao meu lindo amor, Guilherme. Um anjo que sem ele não conseguiria ir até o fim;
- Aos meus pais que tanto se preocuparam e ajudam, sempre compreendendo e dando muito amor;
- À Eliza minha linda e eterna amizade, minha irmã protetora. Agradeço por todo o apoio, carinho e atenção;
- Ao meu irmão Neto, sempre carinhoso e pronto para me apoiar;
- A minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Catarina de Souza Lopes, pelo incentivo, amizade e orientação durante minha carreira acadêmica e na realização deste trabalho;
- Aos meus grandes amigos, orientadores e chefes Dr. Luiz Carlos Alves e Dr. Fábio Brayner os quais sei que posso contar sempre. Agradeço por todo o apoio, confiança e amizade extrema.
- À Prof^a. Dr^a. Maria Amélia Vieira Maciel pelo apoio e incentivo.
- Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE), pela facilidade no uso das instalações e equipamentos desta instituição;
- Aos funcionários do departamento de medicina tropical Walter e Jupira por toda a atenção;
- À Dr^a. Vera Magalhães pelo fornecimento de parte dos isolados utilizados neste estudo;
- Aos colegas Marcela, Juvenal, Adriana, Marília e Guilherme do setor de microscopia eletrônica do LIKA pelo companheirismo e incentivo;
- Ao técnico do setor de Microscopia eletrônica do LIKA Rafael, pelo apoio e incentivo;
- Aos colegas do setor de Biologia Molecular do LIKA;
- Ao técnico Luiz Felipe do Biotério do LIKA, pela ajuda, amizade e incentivo prestado;
- Ao meu amigo Eduardo pelo companheirismo e amizade desde a graduação;

- A todos que fazem parte do CPqAM/FIOCRUZ;
- A todos que fazem o LIKA, que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho;

Ao CNPQ e FACEPE pelo suporte financeiro.

“Pensamentos reduzidos ao papel são geralmente nada mais que pegadas de um homem caminhando na areia, É verdade que vemos o caminho que ele trilhou; mas para saber o que ele viu no caminho precisamos usar nossos próprios olhos.”
Schopenhauer.

RESUMO

Klebsiella pneumoniae é uma enterobactéria responsável por uma alta incidência de infecções hospitalares, causadas geralmente por linhagens portadoras de multirresistência e produtoras de β -lactamases de amplo espectro (ESBL). Este trabalho teve como objetivo determinar os genes envolvidos na formação de beta-lactamases clássicas e ESBLs em isolados de *K. pneumoniae* de Recife-PE, Brasil, assim como investigar o efeito ultra-estrutural causado por diferentes concentrações de antibióticos beta-lactâmicos, em isolados de *K. pneumoniae* produtores de diferentes tipos de beta-lactamases. Foram analisados 52 isolados de *K. pneumoniae* quanto a presença dos genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}, originados da microbiota normal e de infecções na comunidade e hospitalares e para a investigação do gene *bla*_{CTX-M} foram utilizados 19 isolados clínicos de *K. pneumoniae* que apresentaram resistência a cefalosporinas de terceira geração ou ao aztreonam. Os MICs dos isolados foram determinados frente aos antibióticos ceftazidima, cefotaxima e aztreonam. Dois isolados de infecção nosocomial de *K. pneumoniae* foram submetidos a diferentes Sub-MICs de ceftazidima, cefotaxima e aztreonam para a análise pela Microscopia Eletrônica de Transmissão e de Varredura (MET e MEV). O gene *bla*_{SHV} foi detectado em 16 isolados hospitalares, 4 da comunidade e 9 da microbiota, enquanto o gene *bla*_{TEM} foi detectado em 18 isolados hospitalares, 4 da microbiota e 2 da comunidade. Através do sequenciamento de DNA, o gene *bla*_{CTX-M2} foi detectado em três isolados resistentes tanto a ceftazidima quanto a cefotaxima. Adicionalmente, foi encontrada uma nova variante SHV em um dos isolados e a presença de duas variantes anteriormente relatadas a SHV-28 e a SHV-108. As análises dos 2 isolados de *K. pneumoniae* pela MET e MEV mostraram grandes alterações morfológicas e ultra-estruturais dos isolados, quando submetidos aos diferentes Sub-MICs de ceftazidima e cefotaxima. *Nossos resultados mostram que isolados de *K. pneumoniae* portadores de diferentes β -lactamases e resistentes a diferentes antimicrobianos podem sofrer alterações ultra-estruturais significativas quando submetidos a Sub-MICs da droga, o que poderia possibilitar uma melhor atuação do sistema imune de um paciente infectado com esta espécie bacteriana.

Palavras chave: *Klebsiella pneumoniae*, genes de resistência, β -lactâmicos, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is an enterobacteria responsible for a high incidence of hospital infections usually caused by strains carrier of multidrug resistance and producer of broad spectrum β -lactamase (ESBL). This study aimed to determine the genes involved in the formation of classical beta-lactamases and ESBLs in Recife-PE, Brazil, and investigate the ultrastructural effects caused by different concentrations of beta-lactam antibiotics in isolates of *K. pneumoniae* producers of different types of beta-lactamases. It was analyzed 52 isolates of *K. pneumoniae* in order to search for *bla*_{SHV} and *bla*_{TEM} genes, from the microbiot and from community and hospital infections and for the investigation of *bla*_{CTX-M1} gene it was used 19 clinical isolates of *K. pneumoniae* that showed resistance to third-generation cephalosporins or aztreonam. It also was determined the minimum inhibitory concentrations (MICs) of these isolates against ceftazidime, cefotaxime and aztreonam antibiotics. Two isolates of nosocomial infection by *K. pneumoniae* were submitted to different sub-MICs of the ceftazidime, cefotaxime and aztreonam for analysis by Transmission and Scanning Electron Microscopy (TEM and SEM). The *bla*_{SHV} gene was detected in 16 hospital isolates, 4 of the community and 9 of the microbiota, while the *bla*_{TEM} gene was detected in 18 hospital isolates, 4 of the microbiot and 2 of the community. The *bla*_{CTX-M2} gene was detected in 3 isolates resistant both ceftazidime and cefotaxime. It was discovery a new SHV variant in one of the isolates and the presence of two variants previously reported, SHV-28 and SHV-108. The analysis of the 2 isolates of *K. pneumoniae* by TEM and SEM showed large morphological and ultrastructural changes on the isolates, when subjected to different sub-MICs of ceftazidime and cefotaxime. Our results suggest that isolates of *K. pneumoniae* carriers of different β -lactamases and resistant to different antibiotics may show large morphological and ultrastructural changes, when subjected to sub-MICs of the drug, which could enable a better performance of the immune system of a patient infected with this bacterial species.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, gene resistance, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}

Lista de Figuras

Figura 1. Corte longitudinal de uma célula bacteriana gram-negativa.....	25
Artigo	
Figura 1. Eletromicrografias de MET de células controle dos isolados K21.1-F e K16R de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	67
Figura 2. Eletromicrografias de MET de células do isolado K3C de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	68
Figura 3. Eletromicrografias de MET de células do isolado K16R de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	69
Figura 4. Eletromicrografia de MET de células do isolado K21.1-F de <i>Klebsiella pneumoniae</i> submetido a concentração de 0,5 µg/ml ampicilina.....	70
Figura 5. Eletromicrografias de MEV de células do isolado K3C de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	71

Lista de Tabelas

Tabela 1. Origem e perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> analisados no presente trabalho.....	38
Tabela 2. Primers utilizados nas amplificações por PCR e sequenciamento do gene <i>bla</i> _{CTX-M}	42
Tabela 3. Pontos de corte das Concentrações Inibitórias Mínimas frente às penicilinas, cefalosporinas de terceira geração e aztreonam.....	43
Tabela 4. Sub-MICs de amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, ceftazidima e aztreonam, determinados pelo teste de macrodiluição em caldo em isolados de <i>K. pneumoniae</i> , para utilização no processamento pela Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura.....	45
Artigo	
Tabela 1. Origem e perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> analisados no presente trabalho.....	72
Tabela 2. Primers utilizados nas amplificações por PCR e sequenciamento dos genes CTX-M.....	74
Tabela 3. Sub-MICs de amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, ceftazidima e aztreonam, determinados pelo teste de macrodiluição em caldo em isolados de <i>K. pneumoniae</i> , para utilização no processamento pela Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura.....	75
Tabela 4. Presença dos genes <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} em 52 isolados de <i>K. pneumoniae</i> provenientes da microbiota normal, infecções nosocomiais e na comunidade.....	76
Tabela 5. MICs de cefotaxima, ceftazidima e aztreonam e presença dos genes <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{CTX-M2} em isolados de <i>K. pneumoniae</i> (n=19) provenientes de infecções hospitalares e na comunidade em Recife-PE.....	77
Tabela 6. MICs de ampicilina e amoxicilina de isolados de <i>K. pneumoniae</i> provenientes da microbiota normal de fezes e presença dos genes <i>bla</i> _{TEM} e <i>bla</i> _{SHV}	78
Tabela 7. Características das enzimas SHV detectadas em isolados de <i>K. pneumoniae</i> provenientes de infecções hospitalares e na comunidade.....	79

Lista de Abreviaturas

µl	Microlitro
AMO	Amoxicilina
AMP	Ampicilina
ATM	Aztreonam
BHI	Braint Heart Infusion
CAZ	Ceftazidima
CP	Cefoperazona
CTX	Cefotaxima
ESBLs	Extended Spectrum Beta Lactamases
HC	Hospital das Clínicas
HR	Hospital da Restauração
Kb	Quilo base
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
ml	Mililitro
mM	Milimolar
PBPs	Proteínas Fixadoras de Penicilina
rpm	rotações por minuto
SHV	Sulphydryl reagent variable
TEM	Nomeado após o paciente proveniente a primeira amostra (Temoneira)
CTX-M	Ativa a cefotaxima, primeiramente isolada em Munich
MIC	Concentração Inibitória Mínima
Sub-MIC	Sub-Concentração Inibitória Mínima
LPS	Lipopolissacarídeo
dNTP	Desoxinucleotídeo
ddNTP	Didesoxinucleotídeo
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
TE	Tris-EDTA
PCR	Polymease Chain Reaction
TBE	Tris-Borato-EDTA
GA	Glutaraldeído

PFA

Paraformaldeído

UFPE

Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	19
2.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
2.2. Parede celular das bactérias gram-negativas.....	24
2.3. Antibióticos β -lactâmicos.....	25
2.3.1 Penicilinas.....	27
2.3.2. Cefalosporinas e monobactâmicos.....	28
2.4. Resistência bacteriana a antibióticos β - lactâmicos.....	29
2.5. Sequenciamento de DNA.....	32
2.6. Alterações estruturais causados por antimicrobianos β -lactâmicos.....	32
3.0 OBJETIVO.....	34
3.1. Objetivo geral.....	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1. Isolados bacterianos.....	37
4.2. Extração do DNA total.....	39
4.3. Quantificação do DNA total.....	39
4.4. Condições da PCR para identificação dos genes de resistência <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{TEM}	39
4.5. Sequenciamento do gene de resistência <i>bla</i> _{SHV}	40
4.6. PCR e sequenciamento para identificação dos genes de resistência <i>bla</i> _{CTX-M}	41
4.7. Eletroforese em gel de agarose.....	42
4.8. Determinação dos MICs.....	42
4.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	43
4.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	44
4.11. Considerações Éticas.....	45
5.0 ARTIGO.....	46
1. Introdução.....	49
2. Materiais e Métodos.....	50
2.1. Isolados bacterianos.....	50
2.2. Teste de susceptibilidade a antibióticos.....	51
2.3. Amplificação dos genes <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{TEM} por PCR.....	51
2.4. PCR e sequenciamento do gene de resistência <i>bla</i> _{CTX-M}	51
2.5. Sequenciamento do gene <i>bla</i> _{SHV}	52
2.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	53
2.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
3. Resultados e Discussão.....	54
3.1. Susceptibilidade a antimicrobianos.....	54
3.2. Presença dos genes <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{TEM}	55

3.3. Determinação da sequência de nucleotídeos do gene <i>bla</i> _{SHV}	56
3.4. Identificação do gene <i>bla</i> _{CTX-M}	57
3.5. Análises ultra-estruturais e morfológicas.....	59
4. Referências	62
6.0 CONCLUSÕES.....	80
7.0 REFERÊNCIAS.....	82

1.0 INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae é uma espécie bacteriana responsável por uma alta incidência de infecções hospitalares, principalmente em pacientes imunocomprometidos e neonatos, causando pneumonias, septicemias, infecções urinárias e respiratórias. Estas infecções são causadas geralmente por linhagens portadoras de multirresistência e produtoras de β -lactamases de amplo espectro (ESBLs – Extended Spectrum β -lactamases) (TRABULSI *et al.*, 2002).

Os antibióticos β -lactâmicos atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana, pela inativação de várias enzimas, como as Proteínas Fixadoras de Penicilina (PBPs), que participam da síntese final do peptidoglicano. A produção de β -lactamases é um dos mecanismos mais eficientes de resistência a β -lactâmicos em isolados clínicos da família *Enterobacteriaceae* (SANDERS *et al.*, 1992). A atuação destas enzimas se dá pela hidrólise do anel β -lactâmico, transformando os antibióticos correspondentes em produtos inativos (TRABULSI *et al.*, 2002). As β -lactamases clássicas podem ser codificadas por genes cromossômicos como o *bla*_{LEN-1} e o *bla*_{SHV-1}, os quais conferem resistência a ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina, ou por genes plasmidiais como o *bla*_{TEM-1} (CHAVES *et al.*, 2001).

O amplo perfil de resistência a antimicrobianos apresentado por bactérias de diversas espécies levou ao uso de novos β -lactâmicos para o tratamento de infecções por isolados multirresistentes, propiciando uma seleção de bactérias portadoras de genes alterados por mutações pontuais (HAEGGMAN *et al.*, 2004). Mutações no DNA cromossômico ou plasmidial, podem resultar na substituição de um ou mais aminoácidos durante a formação da proteína, aumentando o espectro hidrolítico da enzima transcrita, possibilitando o surgimento das β - lactamases de espectro estendido (Extended Spectrum β -lactamases – ESBLs), enzimas que podem degradar antibióticos β -lactâmicos como as cefalosporinas de 3ª geração e o monobactâmico, aztreonam (PAI *et al.*, 1999; HAEGGMAN *et al.*, 2004; MUNDAY *et al.*, 2004). O aumento do espectro hidrolítico e a diferença do ponto isoelétrico destas enzimas dependem da localização e de quais aminoácidos foram substituídos durante a tradução, modificando a resistência bacteriana em relação a alguns antimicrobianos (PAI *et al.*, 1999; RASHEED *et al.*, 2000). O aumento crescente da variedade de β -lactamases tem sido relatado em isolados de *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e outros membros da família *Enterobacteriaceae*, constituindo um desafio no diagnóstico para os diferentes laboratórios de microbiologia clínica (JACOBY *et al.*, 2006).

A família SHV de ESBLs descrita no mundo hoje, inclui da SHV-2 a SHV-88, sendo codificadas por plasmídeos de alto peso molecular e derivadas da β -lactamase clássica SHV-1, diferindo em poucos aminoácidos da mesma (BUSH *et al.*, 1995; HAEGGMAN *et al.*, 2004). No entanto, a família de ESBLs derivadas do gene *bla*_{TEM-1} ocorre a partir da enzima TEM-3 até TEM-152, sendo todas codificadas por plasmídeos (BUSH *et al.*, 1995; JEONG *et al.*, 2004).

Um outro tipo de ESBL a CTX-M, possui ação mais eficiente contra oxi-amino β -lactâmicos, como a cefotaxima e o aztreonam, quando comparada à ação contra a ceftazidima. (TZOUVELEKIS *et al.*, 2000; PAGANI *et al.*, 2003). Dados da literatura mostram que *K. pneumoniae* é a espécie bacteriana que mais produz ESBLs, principalmente do grupo 2, TEM, SHV e CTX (BUSH *et al.*, 1995; COQUE *et al.*, 2002; CHANAWONG *et al.*, 2002). Não há na literatura, no entanto, relatos que determinem a prevalência e o genótipo de ESBLs em isolados de *K. pneumoniae* no Brasil, Recife-PE.

Desde 1987, Paul Williams e colaboradores relataram que Sub-Concentrações Inibitórias Mínimas de antibióticos (Sub-MICs), em particular de penicilina e de cefalosporinas, podem exercer um efeito grave na morfologia bacteriana e conseqüentemente na superfície celular, onde os danos induzidos pelos antibióticos podem aumentar sensivelmente a sensibilidade dos microrganismos aos mecanismos de defesa do hospedeiro, contribuindo para a erradicação da infecção causada pelo microrganismo. Porém, não há trabalhos que correlacionem as alterações na morfologia da célula bacteriana submetida a Sub-MICs de diferentes antibióticos, quando a bactéria é portadora de diferentes genes para β -lactamases clássicas e de espectro ampliado (ESBLs).

Torna-se evidente a importância do estudo molecular dos mecanismos de resistência a antimicrobianos β -lactâmicos, para determinação dos genes envolvidos na formação de β -lactamases clássicas e ESBLs, assim como a caracterização dos efeitos ultra-estruturais causados por antibióticos β -lactâmicos, frente isolados de *K. pneumoniae* produtores e não produtores destas enzimas.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, foi descrito primeiramente pelo microbiologista alemão Edwin Klebs no final do século XIX. Essas bactérias têm como habitat natural o trato intestinal de seres humanos e animais, sendo também encontradas em águas de superfície, plantas e solo. Muitas cepas de *Klebsiella* 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, *K. pneumoniae* é indol negativa e *Klebsiella oxytoca* é indol-positiva, sendo ambas as espécies imóveis (KONEMAN et al., 2001). Taxonomicamente, as espécies do gênero *Klebsiella* são classificadas em *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica*.. Usualmente refere-se a espécie *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* com *K. pneumoniae*, e às outras duas subespécies como *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis* (PODSCHUM & ULLMANN, 1998).

A espécie *K. pneumoniae* é isolada com maior frequência de amostras clínicas, sendo a principal espécie do gênero, podendo causar uma forma clássica de pneumonia primária, apresentando características radiográficas anormais comparando com algumas infecções piogênicas, tendo alta taxa de mortalidade quando não tratadas (PODSCHUM & ULLMANN, 1998). Esta bactéria é encontrada com frequência de 19% nas fezes de indivíduos saudáveis, porém não é comum encontrá-la na orofaringe destas pessoas (1 a 6%), podendo haver um aumento desta prevalência em pacientes hospitalizados para 20%. Como patógenos oportunistas, *K. pneumoniae* ataca primariamente indivíduos imunocomprometidos quando hospitalizados e com doenças pré-existentes e em condições debilitantes, como o alcoolismo, diabetes mellitus e doença pulmonar obstrutiva crônica (PODSCHUM & ULLMANN, 1998; KONEMAN et al., 2001). São bacilos Gram negativos imóveis, não esporulados, fermentadores de lactose com produção de ácidos, que exibem colônias mucóides com consistência viscosa em meios de seleção primária. (KONEMAN et al., 2001). Estes microrganismos são envolvidos por cápsulas polissacarídicas, nas quais estão presentes diferentes antígenos que permitem a diferenciação do gênero em 77 sorotipos (PODSCHUM & ULLMANN, 1994).

Infecções por *K. pneumoniae* principalmente em pacientes imunocomprometidos ou em condições debilitantes, muitas vezes ocorrem por uma auto-infecção da microbiota da orofaringe ou entérica do paciente, podendo causar também infecções extra-pulmonares,

como enterite e meningite em lactentes, além de infecções urinárias e septicemias em crianças e adultos (PODSCHUM & ULLMANN, 1998). O trato urinário é um dos locais mais comuns de infecções, principalmente em pacientes com doenças renais ou com diabetes mellitus (LYE *et al.*, 1992).

Apesar dos avanços da terapia antimicrobiana, a mortalidade e morbidade associadas a casos de infecções hospitalares continuam significantes mundialmente. De acordo com o Programa de Vigilância Brasileiro MYSTIC, as bactérias Gram-negativas mais envolvidas em infecções hospitalares (septicemias e infecções urinárias e respiratórias) no Brasil são: *Pseudomonas aeruginosa* (30.3%), *Escherichia coli* (18.6%), *Klebsiella pneumoniae* (16.9%), *Acinetobacter baumannii* (8.8%) e *Enterobacter cloacae* (7.1%) (KIFFER *et al.*, 2005). Nos Estados Unidos, *K. pneumoniae* representa o quarto patógeno mais comum de pneumonia e septicemia em unidades de terapia intensiva (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003). De acordo com o “SENTRY Antimicrobial Surveillance Program”, *Klebsiella* spp. foi responsável por 7 a 10% das infecções nosocomiais sistêmicas, durante 1997 e 2003, na Europa, América Latina e América do Norte (BIEDENBACH *et al.*, 2004).

O alto envolvimento de *K. pneumoniae* em infecções graves, esta relacionada à grande facilidade desta espécie na aquisição de plasmídeos de multirresistência, durante o processo de conjugação bacteriana (TRABULSI *et al.*, 2002), os quais podem possibilitar resistência a diferentes classes de antimicrobianos inclusive aos β -lactâmicos, sendo um fator limitante e uma das maiores causas de falhas no tratamento das infecções causadas por esta bactéria.

2.2. Parede celular das bactérias gram-negativas

A parede celular das bactérias Gram-negativas é mais delgada que a das Gram-positivas, porém é estruturalmente mais complexa. Na parte externa da membrana citoplasmática localiza-se o espaço periplasmático, um compartimento que contém várias enzimas e que se encontra entre a membrana citoplasmática e a porção interna da parede celular (Figura 1). Uma simples unidade de camada glicopeptídica forma a borda externa do espaço periplasmático. Apenas metade das cadeias peptídicas unidas aos resíduos de ácido N-acetilmurâmico estão realmente entrecruzadas. Fora da fina camada de glicopeptídeos encontra-se a membrana externa que tem constituição similar a membrana citoplasmática e que encontra-se fixa a camada glicopeptídica por uma lipoproteína. Um outro componente estrutural exclusivo da membrana externa das bactéria Gram-negativas é o lipopolissacarídeo

(LPS), os quais são os principais determinantes antigênicos de superfície das bactérias Gram-negativas e que são responsáveis pela atividade de endotoxinas das células Gram-negativas (KONEMAN *et al.*, 2001; TRABULSI *et al.*, 2002).

Algumas bactérias possuem cápsula externamente a parede celular podendo estar estreita ou frouxamente associada à estrutura externa da parede celular. A cápsula polissacarídica é formada por ácidos polissacarídicos de alto peso molecular, encontrados na superfície celular de muitas espécies bacterianas podendo apresentar várias funções, como proteger a célula da dessecação de materiais tóxicos no ambiente, ajudando na aderência da bactéria a superfícies mucosas, além de exercer resistência a função bactericida do complemento e de anticorpos séricos (KONEMAN *et al.*, 2001; TRABULSI *et al.*, 2002; ANDREA RAHN *et al.*, 2003). Em *Klebsiella* spp. as cápsulas são essenciais a virulência bacteriana além de proteger contra fagocitose de polimorfonucleares (PODSCHUM & ULMAN., 1998).

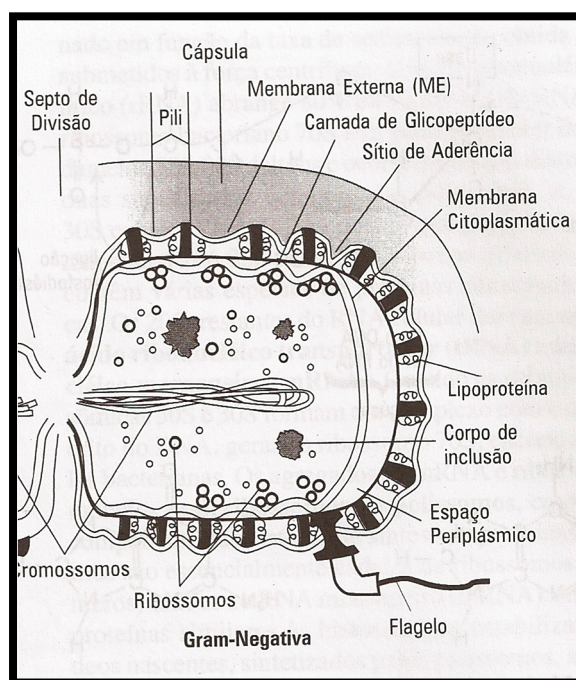


Figura 1. Corte longitudinal de uma célula bacteriana gram-negativa.
(Fonte: Koneman *et al.*, 2001, 5ª edição. p. 07)

2.3. Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos são os antibióticos mais prescritos mundialmente, devido a sua boa atividade e baixa toxicidade (HAEGGMAN *et al.*, 2004). Neste grupo estão incluídas as penicilinas, as cefalosporinas, os carbapenemas e os monobactâmicos, sendo

todos portadores de um anel β -lactâmico, formado de três átomos de carbono e um de nitrogênio (TRABULSI *et al.*, 2002). A entrada do antimicrobiano nas células bacterianas se dá por proteínas denominadas “porinas” as quais se comportam como canais iônicos e que se localizam na membrana externa de bactérias gram-negativas, possuindo afinidade específica pelos diferentes antibióticos (KONEMAN *et al.*, 2001; KD TRIPATHI., 2006).

Esta classe de drogas interfere na síntese da parede celular bacteriana, interfere no crescimento e desenvolvimento normal das células bacterianas. Nos microrganismos Gram-positivos a parede celular tem uma espessura constituída por 50 a 100 moléculas, enquanto nos Gram-negativos tem uma espessura constituída por apenas 1 a 2 moléculas (GOODMAN & GILMAN., 2006). A biossíntese do peptideoglicano envolve cerca de trinta enzimas bacterianas, incluindo as transpeptidases e as glicosiltransferases, podendo ser dividida em três estágios. No primeiro estágio as bactérias sintetizam um pentapeptídeo do UDP-ácido-N-acetilmurâmico e UDP-N-acetilglicosamina, no segundo ocorre a ligação dos dois aminoácidos, onde os radicais de peptideoglicano são unidos entre si formando longos filamentos e o UDP é clivado, e na terceira etapa ocorre o término da formação de ligação cruzada que consiste na clivagem da D-alanina terminal das cadeias peptídicas por transpeptidases e a energia liberada é utilizada no estabelecimento de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas dos filamentos vizinhos dando estabilidade e rigidez à parede celular (KD TRIPATHI., 2006; GOODMAN & GILMAN., 2006). Os antibióticos β -lactâmicos inibem as transpeptidases, não ocorrendo a ligação cruzada, diminuindo a estrutura entrelaçada e rígida da parede celular. Estas proteínas relacionadas a síntese final do peptideoglicano constituem as proteínas fixadoras de penicilina (PBPs - protein binding penicilin) que se localizam na parte externa da membrana celular das bactérias e que podem ser classificadas em três classes baseado na presença do domínio funcional conservado (TRABULSI *et al.*, 2002; McPHERSON & POPHAM., 2002; KD TRIPATHI., 2006). Apenas a classe A de PBPs tem um domínio N-terminal que contém seqüências de aminoácidos conservados encontrados em todas as glicosiltransferases responsáveis pela polimerização do peptideoglicano (McPHERSON & POPHAM., 2002).

As PBPs variam em suas afinidades pelos diferentes antibióticos β -lactâmicos, embora as ligações se tornem covalentes. Algumas PBPs de bactérias Gram-negativas são responsáveis pela síntese do peptideoglicano, outras são necessárias para a manutenção da forma de bastonetes da bactéria na formação de septos durante a divisão bacteriana. A inibição de algumas transpeptidases leva a formação de esferoblastos e a uma rápida lise. Entretanto a inibição das atividades de outras PBPs pode causar lise tardia (PBP2) ou a

produção de longas formas filamentosas da bactéria (PBP3) (GOODMAN & GILMAN., 2006)

Quando as bactérias se dividem na presença de um antibiótico β -lactâmico são produzidas formas deficientes de parede celular e como o meio interno da bactéria é mais hiperosmótico as células intumescem e sofrem ruptura. Em certas condições e no caso de alguns microrganismos são produzidas formas filamentosas ou de morfologia indefinida, incapazes de se multiplicar. O efeito lítico destas substâncias também pode se dever a não repressão de algumas autolisinas bacterianas que normalmente funcionam na divisão celular (TRABULSI *et al.*, 2002; KD TRIPATHI., 2006).

A grande utilização dos β -lactâmicos possibilitou a seleção de isolados resistentes a esta classe de antimicrobianos, levando a elaborações mais recentes de antibióticos, visando a maior eficiência frente a estes isolados bacterianos portadores de resistência. Na maioria dos casos a resistência a este grupo de antimicrobianos é conferida pela produção de enzimas chamadas de β -lactamases, capazes de degradar o anel β -lactâmico dos antibióticos, transformando-os em produtos inativos (BUSH *et al.*, 1995; TRABULSI *et al.*, 2002; HAEGGMAN *et al.*, 2004). Estas enzimas tem sido grandes alvos de estudos microbiológicos, bioquímicos e genéticos no mundo inteiro. Diversas investigações têm descrito mais de 190 proteínas bacterianas com a habilidade de interagir com uma variedade de moléculas descritas como substratos ou inibidores. Devido a esta diversidade de características enzimáticas das β -lactamases, muitas tentativas foram realizadas para categorizar estas enzimas pelo uso de seus atributos bioquímicos (BUSH *et al.*, 1995).

2.3.1 Penicilinas

O termo penicilina se refere ao grupo de mais de 50 antibióticos quimicamente relacionados (TORTORA, FUNKE, CASE, 2000). Todas têm uma estrutura central denominada ácido 6-aminopenicilânico, sendo a diferença entre as várias penicilinas encontrada nas cadeias laterais (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1996) que podem ser produzidas tanto naturalmente quanto na forma semi-sintética (TORTORA, FUNKE, CASE, 2000). As penicilinas naturais são produzidas por certas espécies de fungos do gênero *Penicillium spp* (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1996) e as penicilinas semi-sintéticas podem ser classificadas como:

- As aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina). Foram as primeiras penicilinas com atividade contra bacilos Gram-negativos, como a *E. coli* e o *Haemophylus influenzae*.

A amoxicilina é melhor absorvida por via oral do que a ampicilina e atinge níveis séricos duas vezes maiores (RIBEIRO, 2000);

- Resistentes à penicilinase (isoxazolipenicilinas). São penicilinas modificadas quimicamente e que tem uma cadeia lateral que inibe a ação da penicilinase. Não são ativas contra os estafilococos resistentes à oxacilina, que hoje representam importante problema de resistência bacteriana (HOLTEN, ONUSKO, 2000);
- Carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina). Tem atividade antipseudomonas, notadamente a ticarcilina (TAVARES, 2000);
- Ureidopenicilinas (azlocilina, mezlocilina, piperacilina). São consideradas penicilinas de maior espectro, atuando também contra bactérias Gram-negativas e enterococos (BUSH, JOHNSON, 2000).

Devido a grande produção de β -lactamases por diversas espécies bacterianas faz-se necessário a associação de penicilinas com inibidores de β -lactamases (amoxicilina/clavulanato, ampicilina/sulbactam, ticarcilina/clavulanato, piperacilina/tazobactam), ampliando o espectro de ação desses antimicrobianos, que passam a ter atividade contra bactérias produtoras desta enzima, como o *Haemophilus influenzae*, o *Staphylococcus aureus* e *K. pneumoniae* (BUSH, JOHNSON, 2000).

2.3.2. Cefalosporinas e monobactâmicos

As cefalosporinas são antibióticos bactericidas que formam um grupo de antibióticos semi-sintéticos derivados da “cefalosporina C” obtida do fungo *Cephalosporium* spp, atualmente denominado *Acremonium*. São quimicamente relacionadas às penicilinas, onde o núcleo é constituído por um anel β -lactâmico unido a um anel diidrotiazina possuindo mesmo mecanismo de ação das penicilinas, porém se ligando a proteínas diferentes. Através da adição de diferentes cadeias laterais na posição 7 do anel β -lactâmico, alterando assim o espectro de atividade, e na posição 3 do anel diidrotiazina, alterando a farmacocinética da droga, pode-se produzir numerosos compostos sintéticos. As cefalosporinas podem ser divididas em cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta geração, de acordo com a ordem cronológica de seu desenvolvimento, levando em consideração o espectro e a potência do agente antibacteriano (KD TRIPATHI., 2006; GOODMAN & GILMAN *et al.*, 2006).

As cefalosporinas de primeira geração foram desenvolvidas na década de 60 do século XX, exibindo alta afinidade contra bactérias gram-positivas e menor, mas relativamente moderada, atividade contra bactérias gram-negativas. Como exemplos de cefalosporinas de

primeira geração têm-se a cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefadroxil, cefradina. As cefalosporinas de segunda geração (tais como a cefoxitina, cefuroxima e cefaclor) foram desenvolvidas após as de primeira geração, possuindo uma maior atividade contra microrganismos gram-negativos mas são muito menos ativas do que os agentes de terceira geração. As cefalosporinas de terceira geração, onde inclui-se a ceftazidima, a cefotaxima e cefoperazona, são menos ativas contra cocos Gram-positivos exibindo no entanto, muito mais atividade contra as bactérias Gram-negativas, incluindo isolados produtores de β -lactamases. As cefalosporinas de quarta geração, tal como a cefepima e cefpiroma, possuem amplo espectro de atividade e exibem maior estabilidade em relação às β -lactamases (KD TRIPATHI., 2006; GOODMAN & GILMAN., 2006).

O aztreonam é um composto β -lactâmico monocíclico isolado de *Chromobacterium violaceum*. Este antibiótico interage com proteínas de ligação da penicilina em microrganismos sensíveis e induz a formação de longas estruturas filamentosas. Mostra-se resistente a muitas das β -lactamases que são elaboradas por diferentes espécies bacterianas Gram-negativas (GOODMAN & GILMAN., 2006).

2.4. Resistência bacteriana a antibióticos β - lactâmicos

A resistência adquirida aos β -lactâmicos pode ocorrer basicamente por três mecanismos: alteração de proteínas alvo (PBPs), reduzindo assim a atividade do antibiótico; impermeabilidade da célula bacteriana ao antibiótico, impedindo a chegada do mesmo ao local de ação; e produção de β -lactamases que destroem o antibiótico utilizado. O mecanismo mais comum de resistência das enterobactérias aos β -lactâmicos é a produção de β -lactamases (KAREN BUSH., 2001). As enzimas SHV-1 e TEM-1 inativam penicilinas e algumas cefalosporinas mantendo a sensibilidade aos inibidores de β -lactamases, tais como ácido clavulânico, sendo, porém, inativas contra oximiino cefalosporinas, como a ceftazidima. Entretanto, a partir de 1983, o intenso uso destes antimicrobianos foi seguido de uma evolução destas β -lactamases surgindo as ESBLs (Extended Spectrum B-Lactamase) primeiramente relatadas em isolados de *K. pneumoniae* na Alemanha (SHV-2) e na França em 1984 (TEM-3). Estas enzimas diferem das β -lactamases originais por um ou poucos aminoácidos conferindo atividade hidrolítica contra oximiino cefalosporinas (tais como ceftazidima, cefotaxima e cefoperazona) (SALADIN *et al.*, 2002). Em 1990 surgiram enzimas do tipo TEM resistentes aos inibidores utilizados em combinação com as penicilinas. Posteriormente, surgiu o terceiro subgrupo das enzimas TEM, as quais conferem diferentes

níveis de resistência ao ácido clavulânico e a oximiino cefalosporinas (ROBIN et al., 2007; BRADFORD., 2001). Adicionalmente, na Europa, as ESBLs do tipo CTX-M são as mais produzidas pelas bactérias Gram-negativas, principalmente por *E. Coli* e *K. pneumoniae* (LIVERMORE et al., 2007).

As β -lactamases são enzimas bastante diversificadas, podendo ser agrupadas em quatro classes moleculares (A,B,C e D) ou em três principais grupos de acordo com a classificação de Bush et al (1995): grupo 1, β -lactamases que hidrolizam cefalosporinas e que são pouco inibidas pelo ácido clavulânico (por exemplo, AmpC, MOX-1 e MIR-1); grupo 2, penicilinases, cefalosporinases e ESBLs que geralmente são inibidas pelo ácido clavulânico (por exemplo, LEN, TEM, SHV, CAZ, CTX-M e OXA); e grupo 3, metalo- β -lactamases que hidrolizam penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas e que não são inibidas pelo ácido clavulânico (por exemplo, IMP, VIM, SPM, GIM, CcrA e PCM). O grupo 2 engloba o maior número de β -lactamases, sendo dividido em oito subgrupos. As β -lactamases produzidas por cepas de *K. pneumoniae* são principalmente do grupo 2: penicilinases do subgrupo 2a (LEN-1); penicilinases e cefalosporinases do subgrupo 2b (SHV-1 e TEM-1) e ESBLs do grupo 2be (TEM-3 a 152, SHV-2 a 88 e CTX-M) (BUSH et al., 1995; COQUE et al., 2002; CHANAWONG et al., 2002; HAEGGMAN et al., 2004; JEONG et al., 2004; JACOBY et al., 2006; ROBIN et al., 2007).

As β -lactamases clássicas podem ser codificadas por genes cromossômicos, como o *bla*_{SHV-1} e o *bla*_{LEN-1}, os quais conferem resistência a ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina, além de poderem estar presentes em genes plasmidiais, como o *bla*_{TEM-1}, sendo, as β -lactamases SHV-1, encontradas em alta frequência (80 a 90%) no cromossomo de isolados de *K. pneumoniae* (CHAVES et al., 2001; BRADFORD., 2001).

Recentemente vários estudos tem focado as ESBLs, enzimas geralmente codificadas por genes que estão presentes em plasmídeos de alto peso molecular (DE CHAMPS et al., 1991; SHANNON et al., 1998; LI e LIM., 2000), as quais são um crescente problema, em geral na família *Enterobacteriaceae*, pela grande facilidade da maioria dos membros desta família em adquirir plasmídeos por conjugação, sendo especialmente encontradas em *K. pneumoniae* e *E. coli*. (RASHEED et al., 2000; TRABULSI et al 2002; JEONG et al., 2004). Muitas ESBLs são variantes das β -lactamases clássicas como a TEM-1 e SHV-1, onde houve substituição de um ou mais aminoácidos na cadeia original, aumentando o espectro hidrolítico da enzima, permitindo a inativação de β -lactâmicos mais recentes, como as cefalosporinas de

terceira geração e monobactâmicos como o aztreonam (SABIHA *et al.*, 2001; PAI *et al.*, 1999; MUNDAY *et al.*, 2004).

A família SHV de ESBLs inclui hoje, da SHV-2 a SHV-88, sendo codificadas por plasmídeos de alto peso molecular (60 a 180 Kb), as quais diferem em poucos aminoácidos da SHV-1 (BUSH *et al.*, 1995., HAEGGMAN *et al.*, 2004; ROBIN *et al.*, 2007). Em contraste, a família de ESBLs derivadas do gene *bla*_{TEM-1} origina-se a partir da β -lactamase TEM-3 evoluindo até a TEM-52, sendo todas as β -lactamases TEM originadas de plasmídeos (JEONG *et al.*, 2004; JACOBY *et al.*, 2006).

Nos últimos anos surgiu uma nova família de ESBLs mediada por plasmídeos, a CTX-M, que hidroliza preferencialmente cefotaxima e ceftriaxona (SOGÉ *et al.*, 2005; LIVERMORE *et al.*, 2007). Estas enzimas tem sido freqüentemente encontradas em isolados de *Salmonella entérica* e *E. coli*, mas também em isolados de *K. pneumoniae*. As enzimas CTX-M não são estreitamente relacionadas as β -lactamases SHV e TEM, tendo uma similaridade de apenas 40% com estas duas β -lactamases comumente isoladas (BRADFORD *et al.*, 2001). No decorrer de 10 anos, 50 diferentes tipos de ESBLs CTX-M foram identificadas em várias regiões do mundo incluindo Ásia, África, Europa, América do Norte e do Sul (CHANAWONG *et al.*, 2002; CAO *et al.*, 2002; HSUEH *et al.*, 2002; COQUE *et al.*, 2002; BONNET, 2004; JACOBY E BUSH, 2005; SOGÉ *et al.*, 2006; LIVERMORE *et al.*, 2007). Estas enzimas são codificadas por plasmídeos de alto peso molecular e que possuem um alto nível de atividade hidrolítica frente à cefotaxima quando comparada com ceftazidima, tendo porém sua atividade diminuída na presença de inibidores de β -lactamases como o ácido clavulânico e tazobactam (CAO *et al.*, 2002; PAGANI *et al.*, 2003; VILLEGAS *et al.*, 2003; SOGÉ *et al.*, 2005). Na América do Sul, a classe CTX-M aparece como dominante na Argentina e a β -lactamase CTX-M-12 foi descrita em isolados de *K. pneumoniae* na Colômbia (QUINTEROS *et al.* 2003; VILLEGAS *et al.*, 2003). Na região sudeste do Brasil, enzimas CTX-M foram identificadas em *E. coli*, *E. cloacae* and *K. oxytoca oxytoca* (BONNET *et al.*, 2001; MINARINI *et al.*, 2007; MINARINI *et al.*, 2008), mas apenas em dois estudos isolados de *K. pneumoniae* produtores de β -lactamase da classe CTX-M foram detectados (CTX-M-2 and CTX-M-59) (MINARINI *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2008). No entanto, no nordeste do Brasil a classe de enzimas CTX-M ainda não foi relatada.

A família CTX-M de ESBLs é atualmente classificadas em cinco principais grupos de acordo com a identidade da seqüência de aminoácidos: CTX-M-1 (incluindo CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-11, CTX-M-12, CTX-M-15 e CTX-M-22), CTX-M-2 (inclui a CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7 e Toho-1), CTX-M-8, CTX-M-9

(inclui Toho-2 e Toho-3) e CTX-M-25, sendo os membros das diversas linhagens, diferentes em 10 a 30% nos resíduos de aminoácidos (BRADFORD., 2001; PAGANI *et al.*, 2003, NORDMAN *et al.*, 2006). Atualmente tem sido observada uma emergência e disseminação global de ESBLs CTX-M, as quais tem sido o tipo de ESBL predominante em alguns países da Europa, Ásia e América do Sul, sendo comumente associada a infecções nosocomiais mas que também tem sido relatadas em isolados clínicos de infecções na comunidade (QUINTEROS *et al.*, 2003; MUNDAY *et al.*, 2004; SOGE *et al.*, 2005; LIVERMORE *et al.*, 2007).

2.5. Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento de nucleotídeos permanece como um padrão para a determinação dos genes codificantes para β -lactamases presentes em um isolado bacteriano (BRADFORD., 2001). O princípio básico do seqüenciamento de DNA consiste na separação por tamanho, de subconjuntos de moléculas de DNA. Cada uma dessas moléculas de DNA inicia em uma mesma extremidade 5' comum e termina em um de vários pontos finais alternativos em 3'. Todos os membros de um determinado conjunto apresentam um tipo particular de base em sua extremidade 3'. No método de terminação de cadeia, o DNA é sintetizado pela DNA-polimerase específica a partir de um molde de DNA, e iniciado a partir de uma posição fixa, especificada por um oligonucleotídeo iniciador. O método de terminação de cadeia emprega substratos especiais modificados, os 2'-3'-didesoxinucleotídeos (ddNTPs), que não possuem o grupo 3'-hidroxila, que permitiria a continuidade de crescimento da seqüência do DNA. A DNA-polimerase é capaz de incorporar um 2'-3'-didesoxinucleotídeo na extremidade 3' de uma cadeia polinucleotídica em crescimento, mas uma vez incorporado a presença do nucleotídeo modificado provoca o término do alongamento. A razão é que na extremidade 3' das cadeias em crescimento há ausência do grupo 3'-hidroxila, necessário para o ataque nucleofílico sobre a próxima molécula de substrato a ser incorporada. O comprimento dos fragmentos especifica, portanto, a posição do nucleotídeo na fita molde de DNA após uma eletroforese realizada em coluna dentro do seqüenciador de DNA, realizada com capacidade similar aos géis de poliacrilamida anteriormente utilizados (WATSON *et al.*, 2006).

2.6. Alterações estruturais causados por antimicrobianos β -lactâmicos

O elemento estrutural da parede celular bacteriana é o peptidoglicano, e a importância desta estrutura é demonstrada pelo número de agentes antimicrobianos que tem como alvo este componente ou que interferem em sua síntese (DERREL & DAVID., 2002). As PBPs são enzimas envolvidas na síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana e inclui as transpeptidases, transglicosilases, endopeptidases e carboxipeptidases. Os antibióticos β -lactâmicos se ligam covalentemente a estas PBPs inibindo sua atividade normal e assim causando diferentes alterações na estrutura da célula bacteriana, como alterações na morfologia bacteriana e na estrutura da parede celular bacteriana (CINDY and NEAL., 1999; DERREL & DAVID., 2002).

Desde 1987, Paul Williams relatou que sub-Concentrações Inibitórias Mínimas de antibióticos (Sub-MICs), em particular da penicilina e de cefalosporinas, podem exercer um efeito grave na morfologia bacteriana e conseqüentemente na superfície celular, onde os danos induzidos pelos antibióticos podem aumentar sensivelmente os mecanismos de defesas do hospedeiro, contribuindo para a erradicação da infecção pelo microrganismo. Segundo Held *et al.* (1995), sub-MICs de agentes antimicrobianos podem afetar a produção dos componentes da parede celular bacteriana, resultando em sua redução significativa. Estudos realizados com *E. coli* relatam que bactérias tratadas com sub-MICs de quinolônicos respondem com uma significativa alteração da morfologia celular e grandes distúrbios metabólicos, bem como um aumento da susceptibilidade da bactéria a fagocitose por neutrófilos humanos (HELD *et al.*, 1995). Em 1988, Kadurugamuwa *et al* demonstraram a formação de células bacterianas filamentosas através de experimentos “in vivo” com um isolado de *K. pneumoniae*, submetendo-os a diferentes concentrações de cefaloridina, uma cefalosporina de primeira geração. Adicionalmente, estudos realizados com *Helicobacter pylori*, submetidos a sub-MICs de antibióticos β -lactâmicos, mostraram grandes alterações na membrana e na morfologia celular bacteriana em todos os antibióticos β -lactâmicos testados (CINDY & NEAL., 1999).

3.0 OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Determinar os genes envolvidos na formação de β -lactamases clássicas e ESBLs em isolados de *K. pneumoniae* provenientes de Recife-PE, assim como analisar os efeitos ultra-estruturais, causado por antibióticos β -lactâmicos, em isolados produtores de diferentes tipos de β -lactamases.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a ocorrência dos genes de resistência *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} em isolados de *K. pneumoniae*;
- Determinar possíveis mutações do gene *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} nos diferentes isolados de *K. pneumoniae* que contiverem este gene, através do seqüenciamento de DNA.
- Correlacionar os diferentes genes encontrados com o fenótipo de resistência a antimicrobianos β -lactâmicos nos isolados de *K. pneumoniae*.
- Caracterizar as alterações morfológicas e ultra-estruturais dos isolados de *K. pneumoniae* submetidos à Sub-MICs dos antimicrobianos β -lactâmicos através da Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microscopia eletrônica de Varredura.
- Correlacionar o genótipo e o fenótipo de resistência a antimicrobianos β -lactâmicos dos isolados de *K. pneumoniae* com a análise ultra-estrutural e morfológica dos isolados submetidos à Sub-MICs dos antimicrobianos utilizados.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Isolados bacterianos

Para a realização deste estudo foram analisados 52 isolados de *K. pneumoniae*, 24 isolados de infecções hospitalares, 8 isolados patogênicos provenientes de infecções na comunidade e 20 isolados de *K. pneumoniae* não patogênicos da microbiota normal de fezes e orofaringe de crianças saudáveis entre 4 e 5 anos.

Os isolados nosocomiais foram obtidos de dois hospitais da rede pública do Recife, entre os anos de 1998 a 2000, sendo 12 isolados provenientes do hospital da Restauração (HR) e 12 isolados do hospital das clínicas da UFPE (HC) (tabela 1). Essas linhagens de *K. pneumoniae* foram isoladas de diferentes amostras clínicas e de diferentes pacientes. Os isolados obtidos de infecções na comunidade foram fornecidos por um laboratório particular de análises clínicas da cidade do Recife-PE (tabela 1), durante os anos de 2004 e 2005. Os isolados não patogênicos da microbiota normal analisados neste trabalho (tabela 1) foram obtidos de amostras de fezes e de secreção de orofaringe de crianças saudáveis, com idades entre 3 e 4 anos da creche pública Lar Fabiano de Cristo no bairro da Várzea, Recife-PE, entre os anos de 2003 e 2004. Para obtenção das amostras, houve permissão assinada pelos responsáveis (termo de consentimento livre e esclarecido). Todos os isolados bacterianos foram mantidos em estoque congelado e para análise foram cultivados em caldo BHI por 18 horas a 37°C.

Os isolados de *K. pneumoniae* analisados neste trabalho, foram caracterizados anteriormente em outros estudos quanto a sensibilidade a antimicrobianos pelo teste de difusão de disco (NCCLS, 1997), presença ou ausência de ESBLs através do teste de sinergia de disco duplo e perfil plasmidial (Veras *et al.*, 2007; Souza Lopes *et al.*, 2005). Considerando que recentes dados da literatura européia sugerem que as β -lactamases SHV e TEM apresentam uma alta prevalência em isolados de *K. pneumoniae* (HAEGGMAN *et al.*, 2004), foram analisados por PCR para os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} todos os 52 isolados de *K. pneumoniae* obtidos sendo produtores de ESBL ou não. Para o gene *bla*_{CTX-M}, foram analisados 19 isolados, pois estes apresentam características fenotípicas de resistência a pelo menos uma cefalosporina de terceira geração ou ao aztreonam (tabela 1), obtidos de infecções hospitalares (n=16) e na comunidade (n=3).

Tabela 1. Origem e perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados de *K. pneumoniae* analisados no presente trabalho.

<i>Isolado^(a)</i>	<i>Origem</i>	<i>Fonte de isolamento</i>	<i>Perfil de resistência a antimicrobianos β-lactâmicos^(b)</i>	<i>ESBL^(c)</i>
K10-R, K6-R, K13-R*	Hospitalar	Secreção respiratória	AMP,AMO,CTX(Int.)	Neg.
K15-R	Hospitalar	Sangue	AMP,AMO,AMC,CTX,CP	Neg.
K16-R*	Hospitalar	Urina	AMP,AMO, AMC(Int.),ATM,CTX CP	Pos.
K17-R, K14-R	Hospitalar	Secreção respiratória	AMP,AMO	Neg.
K20-R,K3-C*, K19-R*, K16-C*	Hospitalar	Urina	AMP,AMO,CTX(Int.)	Neg.
K7-C	Hospitalar	Urina	AMP,AMO,CTX(Int.)	Neg.
K10-C*	Hospitalar	Urina	AMP,AMO,AMC(Int.),ATM, CAZ(Int.),CTX(Int.)	Neg.
K11-C, K8-C, K11-R, K18-R, K2-R, K17-C	Hospitalar	Urina	AMP,AMO	Neg.
K12-C	Hospitalar	Urina	AMP,AMO,CTX(Int.)	Pos.
K13-C	Hospitalar	Ferida	AMP,AMO,CTX,CP	Pos.
K14-C*	Hospitalar	Ferida	AMP,AMO,CTX(Int.)	Neg.
K15-C	Hospitalar	Urina	AMP,AMO, CTX(Int.),CP(Int.)	Pos.
K18-C	Hospitalar	Urina	AMP,AMO,CP	Pos.
K3-CM*	Comunidade	Urina	AMP,AMO, AMC,CAZ, CTX	Pos.
K4-CM, K6-CM, K8-CM, K10-CM, K12-CM	Comunidade	Urina	AMP,AMO	Neg.
K9-CM	Comunidade	Urina	AMP,AMO,ATM(Int.)	Neg.
K11-CM	Comunidade	Urina	AMP,AMO,AMC,CAZ(Int.), ATM	Pos.
K22-ORO	Microbiota normal	Secreção de orofaringe	AMP,AMO	Neg.
K3.2-F, K58.2-F, K63.1-F, K68-F, K6.3-F, K58.3-F, K7.1-F	Microbiota normal	Fezes	AMP,AMO	Neg.
K10.1-F, K24.2-F, K51.1-F, 21.2-F, K7.2-F, K13.3-F, K63.2-F, K10.2-F	Microbiota normal	Fezes	AMP,AMO	Neg.
K3.1-F, K24.1-F	Microbiota normal	Fezes	Sens. AMP,AMO	Neg.
21.1-F, 58.1-F	Microbiota normal	Fezes	AMO(Int.)	Neg.

^(a) Identificação dos isolados bacterianos: -R, Hospital da Restauração –PE; -C, Hospital das Clínicas da UFPE; -CM, isolados de infecções na comunidade; -ORO, isolado da microbiota normal da orofaringe; -F, isolados da microbiota normal de fezes.

^(b) AMP, Ampicilina; AMO, Amoxicilina; ATM, Aztreonam; CAZ, ceftazidima; AMC, Amoxicilina - Clavulanato; CTX, Cefotaxima; CP, Cefoperazona; Int., Intermediário.

^(c) ESBL, teste de sinergia de disco duplo (Veras *et al.*, 2007; Souza Lopes *et al.*, 2005)

* Isolados seqüenciados para o gene *bla_{SHV}*.

4.2. Extração do DNA total

Foi realizada a extração do DNA total de todos os 52 isolados de *K. pneumoniae* segundo Maniatis *et al* (1982). Os isolados bacterianos foram crescidos por 18 horas a 37°C e 1 ml da cultura foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e 500µl de TE (10:1) foi então adicionado ao sedimento, sendo realizada uma nova centrifugação. Ao precipitado foi adicionado 500µl de TE e 10µl de Proteinase K (5mg/ml), após homogeneização a suspensão foi incubada a 60°C por 20 minutos. A lise foi concluída pela adição de 100µl de STE (2,5% SDS; 0,25M EDTA; 10mM Tris pH 8,0) e incubação por 15 minutos a 60°C, 5 minutos à temperatura ambiente e posteriormente 5 minutos em gelo. Em seguida, acrescentou-se 130µl de acetato de potássio 5M seguindo-se de homogeneização. A solução então foi mantida em gelo por 15 minutos para a precipitação do DNA. Após a centrifugação por 10 minutos, o sobrenadante de aproximadamente 700µl, foi transferido para outro tubo adicionando-se o mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), seguido de centrifugação por 5 minutos. O sobrenadante foi removido para outro tubo e o DNA precipitado com aproximadamente 420µl de isopropanol, incubado a -20°C por 18 horas ou 20 minutos a -80°C. Em seguida, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos e ao precipitado seco adicionado 10µl de RNase (50µg/ml). O DNA extraído foi estocado a -20°C para análises de quantificação de DNA, PCR e seqüenciamento de DNA.

4.3. Quantificação do DNA total

O DNA de todos os isolados de *K. pneumoniae* após a extração foi quantificado por comparação com quantidade conhecida do DNA do fago *lambda* clivado com a enzima *Hind* III (Sigma). Uma alíquota de 1,0µl do DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris-borato 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA 0,002M) à temperatura ambiente e sob corrente constante de 20mA e 100V. Após a migração, o DNA foi corado com brometo de etídio (10mg/ml) e observado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e registrado em um sistema de foto documentação Kodak.

4.4. Condições da PCR para identificação dos genes de resistência *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}*

Os genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* foram investigados pela técnica da PCR, com os iniciadores 5'-GGTTATGCGTTATATTCGCC-3' e 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3' (RASHEED *et al.*, 1997), para o gene *bla_{SHV}*; 5'-ATGAGTATTCAACATTT-3' e 5'-TACTGTCATGCCATCC-3' (RASHEED *et al.*, 1997) para o gene *bla_{TEM}*. Cinquenta e dois isolados de *K. pneumoniae* foram analisados quanto a presença dos genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}*. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 20ng/µl, 1,2U da enzima *Taq* DNA polimerase (Gibco BRL), 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (Pharmacia Biotech), 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmol dos primers para o gene *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}*, além de 2,5 µl de tampão (10x) e 15,3 µl de água MilliQ estéril. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA, e um controle positivo, com o DNA da linhagem de *K. pneumoniae* (K16R) positiva para o gene *bla_{TEM}*, o DNA da cepa de referência ATCC 700603 positiva para o gene *bla_{SHV}*.

As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra) programado, para os genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}*, 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 a uma temperatura de 62° C para o gene *bla_{SHV}* e 57° C para o gene *bla_{TEM}* 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.

4.5. Seqüenciamento do gene de resistência *bla_{SHV}*

O seqüenciamento automático de DNA dos produtos da PCR positivos para o gene *bla_{SHV}* foi realizado utilizando amostras de DNA fita dupla pelo método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo (SANGER *et al.*, 1977), utilizando o seqüenciador MegaBACE 750. Foi realizado o seqüenciamento dos produtos de PCR do gene *bla_{SHV}* proveniente de 8 isolados de *K. pneumoniae* com fenótipo indicativo de produção de ESBLs (com um fenótipo intermediário ou de resistência a alguma cefalosporina de terceira geração ou ao aztreonam, detectado pelo teste de difusão de disco) (tabela 1), visando determinar possíveis mutações nesses genes. Os iniciadores utilizados foram: SHV.FoR: 5'-GGGTTATTCTTATTTGTCGC - 3' (RASHEED *et al.*, 2000) para anelamento na região upstream do gene; SHV.ReE: 5'-CGTTTCCCAGCGGTCAAGG - 3' (ESSACK *et al.*, 2001) para anelamento no interior do gene e SHV.ReR: 5'-AGCGCGAGAAGCATCCTG - 3'

(RASHEED *et al.*, 2000) para anelamento na região downstream do gene.

4.6. PCR e seqüenciamento para identificação dos genes de resistência *bla*_{CTX-M}

O gene de resistência *bla*_{CTX-M} foram inicialmente investigados pela técnica da PCR, com os iniciadores 5'- CGCTTTGCGATGTGCAG-3' e 5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3' (VILLEGAS *et al.*, 2003) para o grupo *bla*_{CTX-M1}. O gene *bla*_{CTX-M1} foi investigado em 19 isolados que eram resistentes a pelo menos uma cefalosporina de terceira geração ou ao aztreonam. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 10ng/µl, 2,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Gibco BRL), 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (Pharmacia Biotech), 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmol dos primers e 2,5 µl de tampão (10x). Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA, e um controle positivo, com o DNA da linhagem de *K. pneumoniae* OKP2 proveniente do Departamento de Microbiologia, ICB-UPE.

As amplificações do gene *bla*_{CTX-M1} foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto a 95 °C para desnaturação, 1 minuto a 55 °C para anelamento do primer e 1 minuto a 72°C para extensão. Após estes ciclos também foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72 °C. Esta PCR foi realizada no setor de Biologia Molecular do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami.

Em seguida, foram utilizados primers mais específicos para cada grupo da família CTX-M, como descritos na Tabela 2, nas mesmas condições de reação de PCR descritas acima, porém com temperatura de anelamento específica para cada primer (Tabela 2). Ambas as fitas dos produtos de PCR, que foram positivas, foram seqüenciadas pelo método de Sanger *et al.* (1977). As seqüências de nucleotídeos foram analisadas pelos programas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Clustal W do European Bioinformatics Institute (<http://www.cbi.ac.uk/>). Esta etapa do trabalho, PCR com primers específicos para os grupos CTX-M e sequenciamento, foi realizada no Centro de Biologia Molecular Severo Ochoa (CSIC - Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Madri, Espanha, pela Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes, com a colaboração do Prof. Dr. Juan Ayala.

Tabela 2. Primers utilizados nas amplificações por PCR e seqüenciamento do gene *bla*_{CTX-M}.

Primer	Seqüência do primer (5' - 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Posição do primer	Referência
CTX-M1-F CTX-M1-R	CGCTTTGCGATGTGCAG ACCGCGATATCGGTTGGT	61	202-218 736-752	Villegas <i>et al.</i> (2004)
CTX-M13U CTX-M13L	GGTTAAAAAATCACTGCGTC TTGGTGACGATTTTAGCCGC	60	65-84 909-928	Saladin <i>et al.</i> (2002)
CTX-M25U CTX-M25L	ATGATGACTCAGAGCATTCG TGGGTACGATTTTCGCCGC	62	6-25 852-871	Saladin <i>et al.</i> (2002)
CTX-M8-IF1 CTX-M8-IR1	ACGAACTGGGTGTGGCGTTG TGTCATCGTGCCATTGACGTG	60	138-156 343-363	Este estudo
CTX-M9U CTX-M9L	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA CCCTTCGGCGATGATTCTC	60	112-131 957-975	Saladin <i>et al.</i> (2002)
CTX-M-G25-F CTX-M-G25-R	CCGTCGGTGACAATTCTGGC AGAAAAAGCGTAAGGCGGGC	60	7-26 850-859	Este estudo

4.7. Eletroforese em gel de agarose

Aos produtos da PCR, foram adicionados 2 µl de tampão de amostra (azul de bromofenol, 30% de glicerol em TE) e realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE a temperatura ambiente, por uma hora e trinta minutos, a 100V e 50mA. Após a migração do DNA, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (1 µg/ml) por 10 minutos e lavado em água destilada por 20 minutos. O DNA então foi observado em luz UV no transiluminador, para se determinar o tamanho em pb do produto da PCR por comparação com o marcador de peso molecular de 100pb, sendo registrado em sistema de fotodocumentação Kodak.

4.8. Determinação dos MICs

Os MICs de amoxicilina e ampicilina foram determinados para os isolados da microbiota normal que apresentaram sensibilidade a alguma penicilina testada pelo teste de difusão de disco (n=4) (tabela 1). Os MICs de ceftazidima, cefotaxima e aztreonam foram determinados para os isolados hospitalares e da comunidade que apresentaram resistência ou resistência intermediária a algum destes antibióticos, pelo método de difusão de disco (n=19) (Tabela 1). O teste de microdiluição em caldo foi realizado segundo as normas do National

Committee for Clinical Laboratory Standards (2006) utilizando a cepa de referência de *K. pneumoniae* ATCC 700603 como controle de qualidade. Os isolados bacterianos foram inoculados em 1 ml de caldo BHI e mantidos por 18 horas em estufa a 37° C. O inóculo foi comparado e ajustado com a escala 0,5 de MacFarland, correspondente a 2×10^8 CFU/ml. Após 15 minutos foi realizada uma diluição 1:1, adicionando-se um ml da solução do antibiótico testado na concentração desejada, a 995 µl de caldo BHI estéril e a 5 µl do inóculo bacteriano anteriormente ajustado. Em seguida, os inóculos finais foram mantidos a 37° C por 18 horas para determinação do MIC dos antibióticos testados para cada isolado.

Os MICs foram determinados usando concentrações derivadas de diluições duplas seriadas em base 2 (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 µg/ml). O critério de sensibilidade e resistência utilizado foi o proposto pelo NCCLS (2006) (tabela2).

Tabela 3. Pontos de corte das Concentrações Inibitórias Mínimas frente às penicilinas, cefalosporinas de terceira geração e aztreonam.

Ponto de corte para MIC (µg/ml)		
Cefalosporinas	Resistente	Sensível
Cefotaxima	≥ 64	≤ 8
Ceftazidima	≥ 32	≤ 8
Monobactâmico		
Aztreonam	≥ 32	≤ 8
Penicilinas		
Ampicilina	≥ 32	≤ 8
Amoxicilina	≥ 32	≤ 8

4.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a análise pela MET foram utilizados quatro isolados de *K. pneumoniae* da microbiota normal submetidos a Sub-MICs de ampicilina e amoxicilina (tabela 3) que apresentaram sensibilidade a alguma das penicilinas testadas pelo método de difusão de disco (n=4) (tabela 1). Foram analisados também dois isolados hospitalares na presença de Sub-MICs de ceftazidima, cefotaxima e aztreonam (tabela 3). Estes isolados apresentaram resistência a cefotaxima e ceftazidima pelo teste de macrodiluição e contiveram pelo menos dois dos genes analisados. Todos os isolados foram inoculados em meio BHI por 18 horas a

37° C na presença ou ausência do antibiótico a ser analisado conforme o protocolo do NCCLS (2006), sendo incluído em todos os processamentos um único controle do isolado nas mesmas condições e diluições sem o antibiótico. As células bacterianas foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH, 7,4 e centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos para posterior fixação em Tampão fosfato 0,1M e glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído 4%. Após a fixação foram realizadas 3 lavagens em tampão fosfato 0,1M e pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M por 90 minutos. Posteriormente foram realizadas três lavagens, duas em tampão fosfato 0,1M e uma em água destilada para contrastação em acetato de uranila a 5% por 1 hora. Em seguida foram realizadas 3 lavagens com água destilada para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de acetona a 30, 50, 70, 80, 90 e três vezes a 100%, por 10 minutos cada etapa. Após a desidratação foi realizada a infiltração do material para substituição da acetona por resina (epon) em séries crescentes e overnight de 2:1, 1:1, 1:2, 3:1 e resina pura. O material foi emblocado, realizado cortes ultrafinos para contrastação com acetato de uranila por 30 minutos e citrato de chumbo por 10 minutos ZEISS EM109.

4.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise pela MEV foram analisados dois isolados hospitalares na presença de Sub-MICs de ceftazidima, cefotaxima e aztreonam (tabela 3). Estes isolados apresentaram resistência a cefotaxima e ceftazidima pelo teste de macrodiluição e contiveram pelo menos dois dos genes analisados. Em todos os processamentos foram incluídas um controle do isolado nas mesmas condições e diluições, sem a presença do antibiótico. Todos os isolados foram inoculados em meio BHI por 18 horas a 37° C na presença ou ausência do antibiótico a ser analisado conforme o protocolo do NCCLS (2006), sendo incluído em todos os processamentos um único controle do isolado nas mesmas condições e diluições sem o antibiótico. As culturas foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH, 7,4 e centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos 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 seco 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 superfície dos isolados bacterianos no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5600 LV.

Tabela 4. Sub-MICs de amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, ceftazidima e aztreonam, determinados pelo teste de macrodiluição em caldo em isolados de *K. pneumoniae*, para utilização no processamento pela Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura.

Isolado ^(a)	Sub-MICs de amoxicilina (µg/ml)	Sub-MICs de ampicilina (µg/ml)	Sub-MICs de cefotaxima (µg/ml)	Sub-MICs de ceftazidima (µg/ml)	Sub-MICs aztreonam (µg/ml)
K58.1-F (MET)	0,5 ; 4,0 ; 16	0,5 ; 8,0	--	--	--
K24.1-F (MET)	0,5 ; 2,0	0,5	--	--	--
K21.1-F (MET)	0,5 ; 16 ; 64 ; 128	0,5 ; 16 ; 32 ; 64	--	--	--
K3.1-F (MET)	0,5 ; 4,0	2,0 ; 4,0	--	--	--
K3C (MET)	--	--	64; 32	32; 16	32; 16
K16R (MET)	--	--	64; 32	16; 8	4
K3C (MEV)	--	--	32	32	32
K16R(MEV)	--	--	32	16	4

^(a) Identificação dos isolados bacterianos: C, Hospital das Clínicas da UFPE; R, Hospital da Restauração-PE; -F, isolados da microbiota normal de fezes. MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão; MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura. – MICs não determinados.

4.11. Considerações Éticas

Os procedimentos descritos para a utilização experimental dos referidos isolados patogênicos de *K. pneumoniae* não necessitam serem encaminhados à Comissão de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), já que os isolados se tratam de amostras secundárias de laboratórios e não dispomos de nenhum contato ou dados de pacientes. Entretanto, os isolados da microbiota normal foram coletados de acordo com trabalho aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (protocolo de número 310/2003-CEP/CCS): “Estudo comparativo de isolados patogênicos e não patogênicos de *Klebsiella pneumoniae* através de métodos moleculares e fenotípicos”.

**ESTUDO MOLECULAR DOS FATORES DE RESISTÊNCIA EM ISOLADOS DE
Klebsiella pneumoniae OBTIDOS DE RECIFE-PE E CARACTERIZAÇÃO ULTRA-
ESTRUTURAL DA AÇÃO DE ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS**

Dyana Leal Veras Diniz ^{a, b, d, e *}

Fábio André Brayner dos Santos ^{b, d, e}

Maria Amélia Vieira Maciel ^c

Luiz Carlos Alves ^{b, d, e}

Ana Catarina de Souza Lopes ^{a, c}

^a Setor de Biologia Molecular do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-
Universidade Federal de Pernambuco – LIKA/UFPE – Brasil.

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

^c Departamento de Medicina Tropical – Universidade Federal de Pernambuco/UFPE.

^d Setor de Microscopia eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-
Universidade Federal de Pernambuco – LIKA/UFPE – Brasil.

^e Faculdade de Ciências Humanas de Olinda-FACHO

*Endereço para correspondência:

Dyana Leal Veras Diniz

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/Fiocruz

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

CEP: 50.670-420 Caixa Postal: 7472

Telefone: (81) 2101-2643/2101-2542. E-mail: dyana_leal@yahoo.com.br

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is an enterobacteria responsible for a high incidence of hospital infections usually caused by strains carrier of multidrug resistance and producer of broad spectrum β -lactamase (ESBL). This study aimed to determine the genes involved in the formation of classical β -lactamases and ESBLs in Recife-PE, Brazil, and investigate the ultrastructural effects caused by different concentrations of β -lactam antibiotics in isolates of *K. pneumoniae* producers of different types of β -lactamases. It was analyzed 52 isolates of *K. pneumoniae* in order to search for *bla*_{SHV} and *bla*_{TEM} genes, from the microbiot and from community and hospital infections and for the investigation of *bla*_{CTX-M1} gene it was used 19 clinical isolates of *K. pneumoniae* that showed resistance to third-generation cephalosporins or aztreonam. It also was determined the minimum inhibitory concentrations (MICs) of these isolates against ceftazidime, cefotaxime and aztreonam antibiotics. Two isolates of nosocomial infection by *K. pneumoniae* were submitted to different sub-MICs of the ceftazidime, cefotaxime and aztreonam for analysis by Transmission and Scanning Electron Microscopy (TEM and SEM). The *bla*_{SHV} gene was detected in 16 hospital isolates, 4 of the community and 9 of the microbiota, while the *bla*_{TEM} gene was detected in 18 hospital isolates, 4 of the microbiot and 2 of the community. The *bla*_{CTX-M2} gene was detected in 3 isolates resistant both ceftazidime and cefotaxime. It was discovery a new SHV variant in one of the isolates and the presence of two variants previously reported, SHV-28 and SHV-108. The analysis of the 2 isolates of *K. pneumoniae* by TEM and SEM showed large morphological and ultrastructural changes on the isolates, when subjected to different sub-MICs of ceftazidime and cefotaxime. Our results suggest that isolates of *K. pneumoniae* carriers of different β -lactamases and resistant to different antibiotics may show large morphological and ultrastructural changes, when subjected to sub-MICs of the drug, which could enable a better performance of the immune system of a patient infected with this bacterial species.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, gene resistance, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}

1. Introdução

Klebsiella pneumoniae é uma espécie bacteriana amplamente envolvida em casos de infecções hospitalares. A maioria dos isolados desta espécie bacteriana carrega o gene para β -lactamase cromossômica de classe A SHV-1, que possui atividade limitada contra ampicilina, não hidrolizando antibióticos β -lactâmicos de amplo-espectro (NELSON, HEIDI AND GAY, 2003).

Os antibióticos β -lactâmicos constituem uma das mais importantes famílias de antimicrobianos, devido sua eficiência, atividade bactericida e baixa toxicidade (ROBIN *et al.*, 2007). Estes antimicrobianos atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana, pela inativação de várias enzimas, como as PBPs (Proteínas Fixadoras de Penicilina), que participam da síntese final do peptidoglicano e que são essenciais para o crescimento e divisão das células bacterianas (LEGAREE *et al.*, 2007). As PBPs constituem alvos letais dos β -lactâmicos e sua inibição leva a degradação da parede celular bacteriana e a eventual lise celular (STEFANOVA *et al.*, 2003).

A produção de β -lactamases é um dos mecanismos mais eficientes de resistência a β -lactâmicos em isolados clínicos da família *Enterobacteriaceae* (ROBIN *et al.*, 2007). As β -lactamases clássicas podem ser codificadas por genes cromossômicos como o *bla*_{LEN-1} e o *bla*_{SHV-1} ou por genes plasmidiais como o *bla*_{TEM-1}, os quais conferem resistência a ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina.

Mutações dos genes para β -lactamases clássicas podem resultar na substituição de um ou mais aminoácidos durante a formação da proteína, aumentando o espectro hidrolítico da enzima transcrita. Estas mutações possibilitam o surgimento das β -lactamases de espectro estendido (Extended Spectrum β -lactamases – ESBLs), enzimas que podem hidrolizar antibióticos β -lactâmicos de última geração, tais como cefotaxima, ceftazidima, cefepime e aztreonam (PAI *et al.*, 1999; HAEGGMAN *et al.*, 2004; MUNDAY *et al.*, 2004). Estas enzimas incluem as famílias CTX-M, PER, VEB, GES, TEM E SHV (PERILLI *et al.*, 2007).

A produção de ESBLs por isolados nosocomiais está frequentemente associada com surtos de infecção hospitalar, sendo comumente encontrada em isolados de *K. pneumoniae* (RASHEED *et al.*, 2000), constituindo um problema de saúde mundial (TASBAKAN *et al.*, 2008). A família de ESBL CTX-M, possui ação mais eficiente contra oxi-amino β -lactâmicos, como a cefotaxima e o aztreonam, quando comparada à ação contra a ceftazidima. (TZOUVELEKIS *et al.*, 2000; PAGANI *et al.*, 2003). Dados da literatura mostram que *K.*

pneumoniae é a espécie bacteriana que mais produz ESBLs, principalmente do grupo 2, TEM, SHV e CTX (BUSH *et al.*, 1995; COQUE *et al.*, 2002; CHANAWONG *et al.*, 2002).

Desde 1987, Lorian e Ernst relataram que Sub-Concentrações Inibitórias Mínimas (Sub-MICs) de antibióticos β -lactâmicos, bem como de outros agentes antimicrobianos, alteram a ultra-estrutura da bactéria e inibem a separação do genoma replicado de bacilos gram-negativos resultando na formação de filamentos. Estas formas alteradas usualmente exibem baixa patogenicidade, diminuição da aderência a células epiteliais e aumento da susceptibilidade a fagocitose por polimorfonucleares, contribuindo para a erradicação da infecção causada pelo microrganismo. Apesar da ampla variedade de estudos relacionados a disseminação das diferentes ESBLs produzidas por isolados de *K. pneumoniae* em vários países do mundo, não há estudos realizados no Brasil sobre a prevalência do genótipo de ESBLs. O propósito deste estudo foi determinar quais os genes envolvidos na formação de β -lactamases clássicas e ESBLs em Recife-PE, assim como caracterizar os efeitos ultra-estruturais causados por antibióticos β -lactâmicos, frente isolados de *K. pneumoniae* produtores e não produtores destas enzimas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Isolados bacterianos

Para a realização deste estudo foram analisados 24 isolados patogênicos nosocomiais de *K. pneumoniae* obtidos de dois hospitais da rede pública do Recife-PE, provenientes de diferentes amostras clínicas, entre os anos de 1998 a 2000, sendo 12 isolados provenientes do hospital da Restauração (HR) e 12 isolados do hospital das clínicas da UFPE (HC). Foram analisados também 20 isolados não patogênicos obtidos da microbiota normal de fezes e orofaringe entre os anos de 2003 e 2004 e 8 isolados patogênicos provenientes de infecções na comunidade de diferentes pacientes, fornecidos por um laboratório da rede particular de análises clínicas da cidade do Recife, durante os anos de 2004 e 2005.

Todos os isolados de *K. pneumoniae* analisados neste trabalho (tabela 1), já estavam identificados pelo sistema API 20E (BioMérieux) e caracterizados quanto a sensibilidade a antimicrobianos pelo teste de difusão de disco (NCCLS, 1997), presença ou ausência de ESBLs através do teste de sinergia de disco duplo e perfil plasmidial (SOUZA LOPES *et al.*, 2005; VERAS *et al.*, 2007).

2.2. Teste de susceptibilidade a antibióticos

Os MICs foram determinados pelo método de macrodiluição em caldo segundo as normas do National Committee for Clinical Laboratory Standards (2006), utilizando a cepa de referência de *K. pneumoniae* ATCC 700603 como controle de qualidade. Os MICs de ampicilina e amoxicilina foram determinados para quatro isolados da microbiota normal que apresentaram sensibilidade a pelo menos um destes antimicrobianos pelo teste de difusão de disco. Os MICs de cefotaxima, ceftazidima e aztreonam foram determinados para dezenove isolados de *K. pneumoniae* patogênicos obtidos de infecções nosocomiais e na comunidade, que apresentaram perfil de resistência ou resistência intermediária a estes antimicrobianos.

2.3. Amplificação dos genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* por PCR

Foram analisados por PCR para os genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* todos os 52 isolados de *K. pneumoniae* obtidos de diferentes origens, utilizando os primers 5'-GGTTATGCGTTATATTCGCC-3' e 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3' (RASHEED *et al.*, 1997), para o gene *bla_{SHV}*; e 5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA -3' e 5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC -3' (MABILAT *et al.*, 1993) para o gene *bla_{TEM}*. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 20ng/µl, 1,2U da enzima *Taq* DNA polimerase (Gibco BRL), 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (Pharmacia Biotech), 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmol dos primers, além de 2,5 µl de tampão (10x). As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra), utilizando a seguinte ciclagem: 5 minutos a 96°C para desnaturação, seguido de 35 ciclos consistindo cada ciclo de 1 minuto a 96°C para desnaturação, 1 minuto a uma temperatura de 62° C para o gene *bla_{SHV}* e 57° C para o gene *bla_{TEM}* 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.

2.4. PCR e seqüenciamento do gene de resistência *bla_{CTX-M}*

Os genes de resistência *bla_{CTX-M}* foram inicialmente investigados pela técnica da PCR, com os iniciadores 5'- CGCTTTGCGATGTGCAG-3' e 5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3' (VILLEGAS *et al.*, 2003) para o grupo *bla_{CTX-M1}*. O gene *bla_{CTX-M1}* foi investigado em 19

isolados que eram resistentes a pelo menos uma cefalosporina de terceira geração ou ao aztreonam. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 10ng/µl, 2,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Gibco BRL), 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (Pharmacia Biotech), 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmol dos primers e 2,5 µl de tampão (10x). Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA, e um controle positivo, com o DNA da linhagem de *K. pneumoniae* OKP2 proveniente do Departamento de Microbiologia, ICB-UPE.

As amplificações do gene *bla*_{CTX-M1} foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto a 95 °C para desnaturação, 1 minuto a 55 °C para anelamento do primer e 1 minuto a 72°C para extensão. Após estes ciclos também foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72 °C. O produto da PCR para o gene em questão é de 593 pb.

Em seguida, foram utilizados primers mais específicos para cada grupo da família CTX-M, como descritos na Tabela 2, nas mesmas condições de reação de PCR descritas acima, porém com temperatura de anelamento específica para cada primer. Ambas as fitas dos produtos de PCR, que foram positivas, foram seqüenciadas pelo método de Sanger *et al.* (1977). As seqüências de nucleotídeos foram analisadas pelos programas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Clustal W.

2.5. Seqüenciamento do gene *bla*_{SHV}

O seqüenciamento dos produtos da PCR do gene *bla*_{SHV} amplificados de 8 isolados de *K. pneumoniae* obtidos de infecções nosocomiais e na comunidade, foi realizado com amostras de DNA fita dupla, através do método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo (SANGER *et al.*, 1977). Os iniciadores utilizados foram: SHV.FoR: 5'-GGGTTATTCTTATTTGTCGC - 3' (RASHEED *et al.*, 2000) para anelamento na região "upstream" do gene; SHV.ReE: 5'- CGTTTCCCAGCGGTCAAGG - 3' (ESSACK *et al.*, 2001) para anelamento no interior do gene e SHV.ReR: 5'- AGCGCGAGAAGCATCCTG - 3' (RASHEED *et al.*, 2000) para anelamento na região "downstream" do gene. A análise da seqüência de DNA e o alinhamento múltiplo foi realizada utilizando o programa DNASTAR. A procura pela similaridade dos dados das seqüências nucleotídicas e a dedução da seqüência protéica foi realizada utilizando o BLAST no National Center for Biotechnology Information

website ([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

2.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a análise pela MET foram utilizados quatro isolados de *K. pneumoniae* da microbiota normal submetidos a Sub-MICs de ampicilina e amoxicilina que apresentaram sensibilidade a alguma das penicilinas testadas pelo método de difusão de disco (n=4) (tabela 3). Foram analisados também dois isolados hospitalares na presença de Sub-MICs de ceftazidima, cefotaxima e aztreonam (tabela 3). Estes isolados apresentaram resistência a cefotaxima e ceftazidima pelo teste de macrodiluição e contiveram pelo menos dois dos genes analisados. Em todos os processamentos foram incluídos um controle do isolado nas mesmas condições e diluições, sem a presença do antibiótico. As culturas foram crescidas na ausência e na presença dos Sub-MICs dos antimicrobianos por 18 horas a 37° C. Após o crescimento as células bacterianas foram centrifugadas, lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 e depois fixadas em tampão fosfato 0,1M, glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% por 60 minutos. Três lavagens foram realizadas em tampão fosfato para pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M por 90 minutos. Após a pós-fixação foram realizadas três lavagens, duas em tampão fosfato 0,1M e uma em água destilada para contrastação em acetato de uranila a 5% por 1 hora. Em seguida foram realizadas 3 lavagens com água destilada para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de acetona. Após a desidratação foi realizada a infiltração e emblocamento do material em resina epon 812. Cortes ultrafinos foram realizados para contrastação com acetato de uranila por 30 minutos e citrato de chumbo por 10 minutos. As amostras foram visualizadas pelo microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM109.

2.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise pela MEV foram analisados dois isolados hospitalares, resistentes a pelo menos uma cefalosporina de terceira geração ou ao aztreonam, na presença de Sub-MICs de ceftazidima, cefotaxima e aztreonam (tabela 3). Estes isolados apresentaram resistência a cefotaxima e ceftazidima pelo teste de macrodiluição e contiveram pelo menos dois dos genes analisados. Em todos os processamentos foram incluídos um controle do isolado nas mesmas condições e diluições, sem a presença do antibiótico. As culturas foram crescidas na ausência ou presença dos Sub-MIC dos antimicrobianos por 18 horas a 37° C. Após o crescimento as

células bacterianas foram centrifugadas gentilmente, lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 e depois fixadas em tampão fosfato 0,1M e glutaraldeído 2,5% por 60 minutos. Três lavagens foram realizadas em tampão fosfato para pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M por 90 minutos. Após a pós-fixação foram realizadas três lavagens em tampão fosfato 0,1M para posterior desidratação, utilizando-se uma série crescente de etanol a 30%, 50%, 70%, 90% e 3 vezes de 100%. Após a desidratação foi realizada a substituição do etanol por dióxido de carbono, obtendo-se a secagem do material para metalização e visualização da superfície das células dos isolados bacterianos no microscópio eletrônico de varredura (MEV). As amostras foram visualizadas pelo microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5600 LV.

3. Resultados e Discussão

3.1. Susceptibilidade a antimicrobianos

Os MICs de ampicilina e amoxicilina determinados para os isolados de *K. pneumoniae* da microbiota normal (n=4) e os MICs de cefotaxima, ceftazidima e aztreonam determinados para os isolados nosocomiais (n=16) e da comunidade (n=3) estão apresentados na tabela 5 e 6. Dois isolados nosocomiais (12%) e dois isolados de infecções na comunidade foram resistentes a ceftazidima e cefotaxima pelo teste macrodiluição em caldo, apresentando MICs superiores a 32µg/ml. Apenas um destes quatro isolados (K16R) não apresentou resistência ao aztreonam. Comparando os resultados do MIC com o teste qualitativo de difusão de disco, foi observado que dois isolados hospitalares (K16R e K3C) resistentes à ceftazidima quanto ao MIC, foram detectados como susceptíveis a ceftazidima pelo teste de difusão de disco. Resultados contrastantes entre os dois métodos também foi verificado com isolados hospitalares analisados quanto à susceptibilidade a cefotaxima, onde 13 isolados foram definidos como resistentes pelo teste de difusão de disco e foram bastante sensíveis pelo teste de macrodiluição em caldo apresentando MICs <0,5µg/ml. Em estudo realizado por Jeong *et al.* (2004), utilizando 2652 isolados clínicos de *K. pneumoniae*, na Coreia, foi encontrada uma maior prevalência de resistência desta espécie bacteriana à cefotaxima (32%), seguida da ceftazidima (29%) e aztreonam (29%). Em estudos realizados no Vietnã com *K. pneumoniae*, também foi encontrada uma maior ocorrência de resistência à cefotaxima (61,5%), do que à ceftazidima (38,4%). (VAN CAO *et al.*, 2002).

Dois isolados de *K. pneumoniae* obtidos da microbiota normal, que não apresentaram

os gene *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}, foram sensíveis a ampicilina e amoxicilina pelo teste de macrodiluição em caldo apresentando MICs <8µg/ml. Apesar do isolado K58.1-F da microbiota não ser portador de nenhum dos genes analisados, apresentou resistência a amoxicilina, porém não a ampicilina. Esta resistência provavelmente é devida a presença de outro gene como o *bla*_{LEN-1} ou a modificações na estrutura de proteínas porinas ou PBPs. Adicionalmente o isolado K21.1-F apresentou resistência tanto a ampicilina como a amoxicilina, apresentando o gene *bla*_{TEM}. Este é o primeiro estudo que relata o perfil fenotípico e genético de resistência de isolados de *K. pneumoniae* obtidos da microbiota normal de indivíduos saudáveis.

3.2. Presença dos genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}

A presença dos genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} nos 52 isolados de *K. pneumoniae* analisados neste estudo estão listados na tabela 4. Dentre os 24 isolados hospitalares de *K. pneumoniae*, todos resistentes a ampicilina, 16 apresentaram o gene *bla*_{SHV} sendo apenas dois destes isolados resistentes a alguma cefalosporinas de terceira geração ou ao aztreonam pelo teste de macrodiluição em caldo (Tabela 4 e 5). A taxa de ocorrência de 66% do gene *bla*_{SHV} entre isolados nosocomiais analisados neste estudo difere das encontradas na Europa e na África, onde foram observadas, respectivamente, taxas de 96% e 100% de ocorrência de β-lactamases do tipo SHV em isolados de *K. pneumoniae* (CHAVES *et al.*, 2001; ESSACK *et al.*, 2001). Com relação ao gene *bla*_{TEM} foi encontrada uma ocorrência de 75% entre os 24 isolados hospitalares de *K. pneumoniae* analisados. Estes resultados demonstram que o gene *bla*_{TEM} é mais prevalente do que o gene *bla*_{SHV} em isolados de *K. pneumoniae* provenientes de infecções hospitalares em Recife-PE, Brasil. Nossos resultados são semelhantes aos obtidos por Prabha *et al.* (2007), em um estudo realizado na Índia, em que a prevalência do gene *bla*_{TEM} (87%) foi maior que a do gene *bla*_{SHV} (75%) em isolados clínicos de *K. pneumoniae* multidroga resistente. No entanto, trabalhos realizados na Espanha com isolados hospitalares de *K. pneumoniae* constatarem o oposto, onde foi encontrada uma maior prevalência de β-lactamases do tipo SHV (96%) quando comparadas com as do tipo TEM (10%) (CHAVES *et al.*, 2001). Adicionalmente, no presente trabalho, quatro isolados hospitalares não apresentaram nenhum dos genes analisados (*bla*_{SHV} ou *bla*_{TEM}). Estes resultados também diferem dos resultados obtidos por Chaves *et al.* (2001), onde todos os isolados clínicos de *K. pneumoniae* analisados foram portadores de pelo menos um desses dois genes.

Um estudo recente realizado na Noruega, utilizando 25 isolados clínicos de *K. pneumoniae* com susceptibilidade reduzida a cefalosporinas de terceira geração ou ao aztreonam, detectou a presença do gene *bla_{SHV}* em 15 isolados e do gene *bla_{TEM}* em nove isolados estudados, relatando uma maior prevalência do gene *bla_{SHV}* do que do gene *bla_{TEM}* (STÅLE TOFTELAND *et al.*, 2007).

Com relação aos oito isolados patogênicos da comunidade, todos apresentaram um fenótipo de resistência a ampicilina havendo uma ocorrência de 50% do gene para β -lactamases do tipo SHV (Tabela 4). Adicionalmente, dois isolados de *K. pneumoniae* apresentaram o gene *bla_{TEM}*, sendo também portador do gene para a β -lactamase SHV. Esses resultados mostram uma maior ocorrência do gene para SHV do que o gene para TEM nos isolados da comunidade, o oposto do encontrado nos isolados hospitalares.

Nos 20 isolados de *K. pneumoniae* da microbiota normal analisados, apenas quatro apresentaram o gene *bla_{TEM}*, todos resistentes a ampicilina. Dezesseis dos isolados de *K. pneumoniae* da microbiota normal analisados apresentaram fenótipo de resistência a ampicilina, mas apenas nove apresentaram o gene *bla_{SHV}*. De forma semelhante ao obtido para os isolados da comunidade, houve uma maior prevalência do gene *bla_{SHV}* do que do gene *bla_{TEM}* nos isolados da microbiota normal. Os quatro isolados da microbiota que não foram resistentes à ampicilina (K58.1-F, K21.1-F, K3.1-F, K24.1-F), pelo teste de difusão de disco, não apresentaram o gene para SHV (Tabela 4). No entanto, dois destes isolados apresentaram resistência a ampicilina pelo teste de microdiluição em caldo com MICs ≥ 32 μ g/ml. Estes resultados contrastam com os obtidos por Haeggman *et al.* (1997), que sugerem que o gene para a β -lactamase clássica SHV está presente no cromossomo de *K. pneumoniae* como um elemento genético espécie-específico, levando a resistência natural a ampicilina nesta espécie bacteriana. Por outro lado, nossos dados estão de acordo com resultados obtidos pelo mesmo autor em estudos posteriores, quando descreve que o gene *bla_{SHV}* é comum mas não universal em *K. pneumoniae* (HAEGGMAN *et al.*, 2004). Este é o primeiro trabalho que correlaciona a presença de genes para β -lactamases em isolados de *K. pneumoniae* obtidos da microbiota normal.

3.3. Determinação da sequência de nucleotídeos do gene *bla_{SHV}*

Os produtos da PCR do gene *bla_{SHV}* de oito isolados de *K. pneumoniae*, resistentes a alguma cefalosporina de terceira geração ou ao aztreonam, foram submetidos ao sequenciamento de DNA e ao alinhamento múltiplo junto às sequência publicadas da família

do gene *bla*_{SHV}. Nos dois isolados hospitalares (K16R e K3CM) resistentes a cefotaxima e ceftazidima com MICs acima de 256µg/ml e de 32 µg/ml, respectivamente, foram encontrados o gene *bla*_{SHV-1} (tabela 7). O gene *bla*_{SHV-1a} foi detectado em dois isolados analisados, sendo um deles (K3C) resistentes aos três antimicrobianos testados, com MICs ≥ 64 µg/ml. A super produção da enzima SHV-1 em isolados clínicos de *K. pneumoniae* tem sido anteriormente relatada em vários estudos, levando ao aumento dos MICs de ceftazidima e do efeito sinérgico com o ácido clavulânico, sugerindo a produção de ESBLs (RICE *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2001, STÅLE TOFTELAND *et al.*, 2007).

Foram encontradas a SHV-28 e SHV-108, anteriormente publicadas, porém não caracterizadas (GenBank número de acesso EU44172 e AM922309). Estas enzimas foram detectadas em isolados bacterianos sensíveis, pelo teste de macrodiluição em caldo, à cefotaxima, ceftazidima e aztreonam, não sendo observada atividade ESBL. Resultados semelhantes foram relatados por Ståle Tofteland *et al.* (2007), onde dois isolados clínicos continham o gene *bla*_{SHV-28} e apresentaram baixos MICs para cefotaxima e ceftazidima. A enzima SHV-108 foi primeiramente descrita em Portugal, em 2008, e a variante SHV-28 foi descrita em 2007 no Sul da Índia, em isolados clínicos de *K. pneumoniae* (CANICA, 2007; KINGSLEY & VERGHESE, 2008). No entanto, este é o primeiro relato destas enzimas no Brasil. Uma outra enzima variante SHV, descrita pela primeira vez no presente estudo, contém as seguintes substituições em relação a enzima SHV-1: Leu31Gln, Arg160Pro, Trp161Pro, Glu162Gly e inserção do aminoácido glicina na posição 163. Esta nova enzima foi encontrada em um isolado proveniente de infecção nosocomial (K19R), também sensível a todos as cefalosporinas de terceira geração testadas e ao aztreonam, apresentando MICs <1,0 µg/ml para todos estes antimicrobianos. Estes dados sugerem que as mutações ocorridas nesta enzima SHV não modificaram seu espectro hidrolítico frente a cefotaxima, aztreonam e ceftazidima ou não houve a expressão deste gene. Segundo Patrícia Bradford (2001), a maioria das SHV variantes com atividade fenotípica de ESBL, são caracterizadas pela substituição de uma serina por glicina na posição 238 e de lisina por glutamato na posição 240, havendo assim aumento do espectro hidrolítico da enzima contra ceftazidima e cefotaxima, respectivamente.

3.4. Identificação do gene *bla*_{CTX-M}

A análise de PCR com os primers CTX-M1 (VILLEGAS *et al.*, 2004) de 20 isolados de *K. pneumoniae* provenientes de Recife, resistentes a alguma cefalosporina de 3^a. Geração

ou ao aztreonam, realizados no LIKA-UFPE, demonstrou que 3 isolados (K16-R, K3-CM e K11-CM) amplificaram o fragmento esperado de 550 pb. Entretanto, análises posteriores, realizadas no Centro de Biologia Molecular Severo Ochoa (Madri, Espanha) com primers mais específicos para o grupo CTX-M1 e CTX-M2, desenhados por Saladin *et al.* (2002), para amplificar a sequência codificante completa dos genes CTX-M, mostraram que esses 3 isolados foram positivos apenas na PCR com os primers específicos para o grupo CTX-M2 (primers CTX-M25U e CTX-M25L) e negativos com os primers específicos para o grupo CTX-M1 (primers CTX-M13U e CTX-M13L). O sequenciamento dos produtos de PCR positivos com os primers CTX-M25U e CTX-M25L, confirmaram que os isolados K16-R, K3-CM e K11-CM apresentavam o gene CTX-M2 com 100% de identidade com o gene para ESBL CTX-M2 identificado em *K. pneumoniae* em São Paulo (GARCIA *et al.*, 2008) e também identificado em *E. coli* em Israel (GenBank número de acesso: AY750915) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Os resultados da análise de PCR quanto à presença dos genes de resistência dos grupos CTX-M8, CTX-M9 e CTX-M25 nos 3 isolados de *K. pneumoniae* mostraram que nenhum deles apresentava os referidos genes. Esses dados revelam que os genes para β -lactamases CTX-M prevalente em Recife são CTX-M2. Este é o primeiro estudo realizado no nordeste brasileiro sobre a ocorrência de ESBLs CTX-M e o gene CTX-M2 foi detectado tanto em um isolado hospitalar quanto em isolados comunitários. No Brasil, apenas outro trabalho, realizado em São Paulo, investigou por sequenciamento a presença de genes CTX-M e também demonstrou a presença do gene CTX-M2 em isolados de *K. pneumoniae*, porém todos os isolados eram provenientes de infecção hospitalar (GARCIA *et al.*, 2008). Portanto, esse é o primeiro relato de isolados de *K. pneumoniae* provenientes de infecções comunitárias no Brasil que apresentam o gene CTX-M.

Em outros países da América do Sul, investigações dos genes CTX-M em *K. pneumoniae*, mostram que na Argentina o gene predominante também é o CTX-M2, enquanto na Colômbia foi detectado o gene CTX-M-12, neste último caso uma CTX-M pertencente ao grupo 1 (RADICE *et al.*, 2002; QUINTEROS *et al.* 2003; VILLEGAS *et al.*, 2004).

Estudos realizados em países da Europa como Reino Unido, França, Espanha, Portugal e Polônia, mostram que é rara a presença de isolados bacterianos produtores de CTX-M do grupo 2, entretanto, predomina CTX-M do grupo 1, principalmente CTX-M15. No Reino Unido e Espanha, além de CTX-M15 também predomina CTX-M9 (LIVERMORE *et al.*, 2007). Portanto, o presente trabalho confirma que a maior incidência de CTX-M2 ocorre em países da América do Sul.

3.5. Análises ultra-estruturais e morfológicas

A análise ultra-estrutural das células controle de *K. pneumoniae* apresenta morfologia conservada com parede celular íntegra e conteúdo citoplasmático com aspecto eletrondenso distribuído uniformemente. As células controle em processo de divisão apresentam formação de septos regulares (Figura 1). Adicionalmente as células controle de todos os isolados de *K. pneumoniae* analisados pela MEV apresentaram comprimento da célula bacteriana normalmente de 1,5 a 2µm (Figura 5).

Apesar do isolado K16R ser resistente a cefotaxima e a ceftazidima e de possuir o gene *bla_{SHV-1}* e os genes *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M2}*, este apresentou diversas alterações quando submetido aos diferentes sub-MICs dos antimicrobianos testados. As alterações mais frequentes das células deste isolado, quando submetido aos sub-MICs de cefotaxima, foram formação irregular de septos e o aumento do espaço periplasmático evidenciado pelo aumento de espaço eletróluscente entre a membrana citoplasmática e a membrana externa das células. Não foram observadas alterações morfológicas e no tamanho celular pela análise na MEV. Em todos as concentrações de ceftazidima que o isolado K16R foi submetido, houveram grandes alterações morfológicas com formação de células alongadas devido a divisões celulares não finalizadas, evidenciada pelo aparecimento de diversas formações iniciais de septos de divisão (Figura 3). Através da MEV foi possível observar células com mais de 15µm de comprimento. Adicionalmente, as alterações ultra-estruturais nas células deste isolado submetidas aos sub-MICs de aztreonam, se caracterizaram pelo aparecimento de estruturas eletróluscentes no citoplasma das células bacterianas, mas com formação regular de septos e sem alterações morfológicas ou no tamanho celular na MET e MEV. Diversas alterações morfológicas já foram relatadas em outros estudos utilizando isolados sensíveis de *Helicobacter pylori* submetidos à sub-MICs de antibióticos β-lactâmicos, incluindo ampicilina e aztreonam, demonstrando a formação de filamentos quando submetidas ao aztreonam e formação de células esféricas quando submetido a outros β-lactâmicos (DELONEY & SCHILLER, 1999). No presente estudo foi observada formação de filamentos quando os isolados foram submetidos a ceftazidima mas não ao aztreonam.

O isolado K3C apesar de possuir resistência aos três antibióticos analisados e possuir o gene *bla_{SHV-1a}* e *bla_{TEM}*, quando submetido aos sub-MICs de cefotaxima apresentou perda de material citoplasmático além de formação irregular de septos, mesmo na concentração mais baixa de antibiótico testada (32µg/ml). Estes resultados sugerem a inibição de PBPs responsáveis pela formação de septos. Trabalhos realizados com *Bacillus subtilis* relataram

alterações na formação de septos durante a divisão bacteriana devido à mutação de diferentes PBPs (DERREL & DAVID, 2003).

Também foram identificadas formação de células filamentosas no isolado K3C, além de formação de bolhas entre a membrana citoplasmática e a membrana externa (membranas blebbings) quando este foi submetido às diversas concentrações de ceftazidima (Figura 2). As alterações produzidas pelas diferentes concentrações de aztreonam neste isolado foram poucas, ocorrendo na maioria das células boa conservação morfológica e ultra-estrutural e formação de septos durante a divisão sem alterações. Porém houve aparecimento de estruturas eletrnluscentes indicando perda de material citoplasmático. Analisando a morfologia dos isolados da microbiota tratados com diferentes concentrações de amoxicilina, foram observadas diferenças significativas entre isolados sensíveis e resistentes a este antibiótico quanto ao método de macrodiluição. Nos isolados sensíveis (K24.1-F e K3.1-F) houveram poucas alterações morfológicas quando submetidos a Sub-MICs da droga, sendo possível no entanto, observar alterações como o aumento do espaço periplasmático, deixando evidente um espaço eletrnluscente entre a membrana externa da célula e a membrana celular interna sugerindo perda ou diminuição da quantidade de glicopeptídeo. Adicionalmente, ficou evidente o aparecimento de estruturas eletrnluscentes que variam no tamanho e quantidade, sugerindo perda de material citoplasmático. Foram observadas algumas células em processo de divisão com formação de septos irregulares. Por outro lado, os isolados resistentes (K58.1-F e K21.1-F) apresentaram de forma geral alterações morfológicas que variam de alongadas a bizarras (Figura 4). Em baixas concentrações (0,5 a 16 µg/ml) foram observadas poucas alterações morfológicas. Já em altas concentrações, as formas alongadas e indefinidas predominam com destruição de parede celular de forma parcial ou total, além da existência de estruturas eletrndensas espalhadas pelo citoplasma da bactéria, demonstrando uma relação de alterações ultra-estruturais dose-dependentes. O isolado K58.1-F, apesar de apresentar um fenótipo de resistência a amoxicilina, apresentou membrana externa irregular e material citoplasmático bem disperso no citoplasma, com aspecto granular já na concentração de 4 µg/ml, indicando grande sofrimento celular. Adicionalmente, ainda pudemos observar formas alteradas e perda de conteúdo citoplasmático com aparecimento de estruturas eletrndensas.

Estudos realizados com *Escherichia coli* pesquisaram quais as afinidades de fixação de diferentes PBPs presentes nesta espécie a diversos antibióticos β-lactâmicos, assim como sua correlação com a formação do peptídeoglicano visando determinar os diferentes efeitos na divisão celular, alongamento e forma celular. Os resultados obtidos revelaram que nesta espécie bacteriana a PBP1 esta envolvida no alongamento bacteriano, PBP2 pela forma

arredondada e PBP3 envolvida na formação de septos (CURTIS et al., 1979; SPRATT et al., 1975).

Os isolados de *K. pneumoniae* tratados com sub-MICs de ampicilina sensíveis a este antimicrobiano (K24.1-F, K58.1-F e K3.1-F) apresentou grandes alterações morfológicas quando submetidos aos Sub-MICs indicados da droga, com formação de células sem forma definida (Figura 4). Adicionalmente, pode-se sugerir que houve perda quase total da parede celular e do conteúdo citoplasmático de algumas células, evidenciado principalmente no isolado K3.1-F quando este foi submetido a concentração de 2 µg/ml de ampicilina. Ficou evidente, além do exposto, o aparecimento de estruturas eletróluscentes e eletrondensas que variam no tamanho e na quantidade, encontrando-se espalhadas pelo citoplasma. Por outro lado, o isolado que apresentou resistência (K21.1-F) demonstrou grandes alterações morfológicas, com alongamento celular já na concentração de 0,5 µg/ml de ampicilina, sem perda aparente de glicopeptídeo. Foi observada simultaneamente, a formação irregular de septos durante a divisão bacteriana (Figura 4), sem observação, porém, de perda de conteúdo citoplasmático mesmo em concentrações mais elevadas. Os dados encontrados mostram a inativação ou inibição de PBPs responsáveis pela formação de septos, de alongamento e forma celular assim como pela formação de peptideoglicano, devido à exposição dos isolados aos antimicrobianos testados nos diferentes isolados bacterianos.

Nossos resultados mostram que isolados de *K. pneumoniae* portadores de diferentes β-lactamases e resistentes a diferentes antimicrobianos podem sofrer alterações ultra-estruturais significativas quando submetidos a Sub-MICs da droga, o que poderia possibilitar uma melhor atuação do sistema imune de um paciente infectado com esta espécie bacteriana.

4. Referências

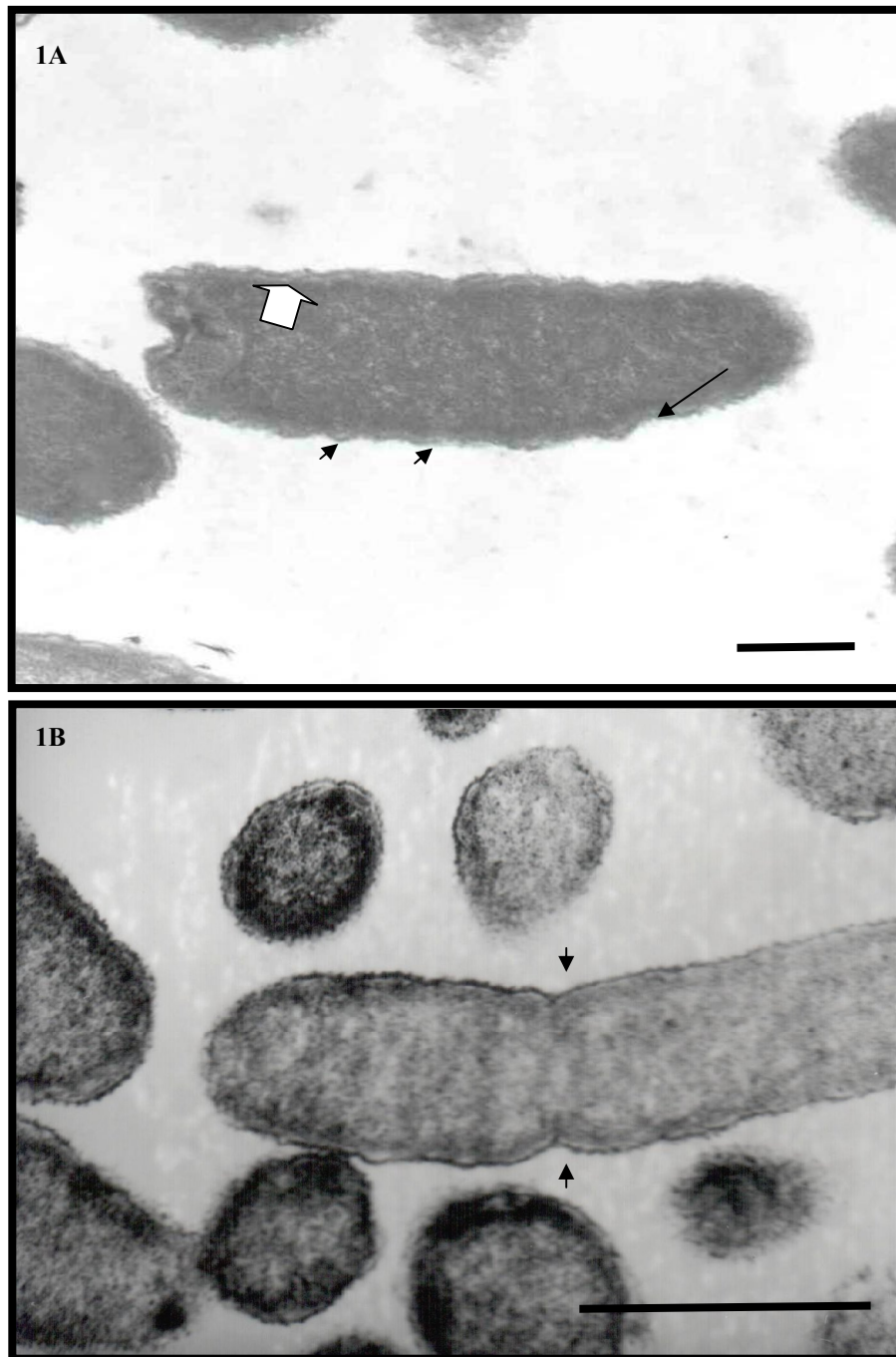
- BUSH, K.; JACOBY, G.A; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.1211-1223, 1995.
- CANICA, M. M.; MENDONÇA, N. First description of the 6 new enzymes SHV in isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Portugal. 2007. Dados não publicados.
- CHANAWONG, A.; M'ZALI, F.H.; HERITAGE, G.; XIONG, J.H.; HAWKEY, P.M. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the people's Republic of China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p. 630-637, 2002.
- CHAVES, J.; MARGARITA G.L.; CONCEPCIÓN S.; AMPARO C.; ROSER R.; CORAL A. SHV-1 β -Lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.2856-2861, 2001.
- COQUE T.M.; OLIVER A.; PÉREZ-DÍAZ J.C.; BAQUERO F. CANTÓN R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, (1989 to 2000)). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, N2, p.500-510, 2002.
- CURTIS N. A. C.; D. ORR; G. W. ROSS; M. G. BOULTON. Competition of β -lactam antibiotics for the penicillin-binding proteins of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus rettgeri*, and *Escherichia coli*: Comparison with antibacterial activity and effects upon bacterial morphology. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.16, p.325-328.
- DELONEY, CINDY R.; NEAL SCHILLER. Competition of various β -lactam antibiotics for the major penicillin-binding proteins of *Helicobacter pylori*: Antibacterial activity and effects on bacterial morphology. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, N11, p.2702-2709, 1999.
- DERRELL C. MCPHERSON AND DAVID L. POPHAM. Peptidoglycan synthesis in the absence of class A penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v.45, N4, p. 1423-1431, 2003.
- ESSACK SABIHA, Y.; LUCINDA, M.C.H; DEVADAS, G.P.; MARGARET, L.M.; DAVID, M.L. Complexity and Diversity of *K. pneumoniae* Strains with Extended Spectrum β -lactamase isolated in 1994 and 1996 at a teaching Hospital in Durban, South Africa. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.45, p.88-95, 2001.

- GARCIA DDE O.; DOI Y.; SZABO D.; ADAMS-HADUCH J. M.; VAZ T. M.; LEITE D.; PADOVEZE M. C.; FREIRE M. P.; SILVEIRA F. P.; PATERSON D. L. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, N5 p.1790-1793. 2008.
- HAEGGMAN S, LOFDAHL S, BURMAN LG. An allelic variant of the chromosomal gene for class A β -lactamase K2, Specific for *Klebsiella pneumoniae*, is the ancestor of SHV-1. **Antimicrob Agents Chemother** 1997; 41:2705-2709.
- HAEGGMAN S, LOFDAHL S, PAAUW A.; VERHOEF J. ; BRISSE S. Diversity and Evolution of the Class A Chromosomal β -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 2400-2408, 2004.
- KINGSLEY, J. D.; VERGHESE, S. rSHV-28, a chromosomal encoded-extended spectrum β -lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in south India. 2008. Dados não publicados.
- LEGAREE B. L.; CALVIN B. A.; ANTHONY J. C.; Overproduction of penicillin-binding protein 2 and its inactive variants causes morphological changes and lysis in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.189, N14, p.4975-4983, 2007.
- LIVERMORE, D.M.; CANTON, R.; GNIADKOWSKI, M.; NORDMANN, P.; ROSSOLINI, G.M.; ARLET, G.; AYALA, J.; COQUE, T.M.; KERN-ZDANOWISZ, I.; LUZZARO, F.; POIREL, L.; WOODFORD, N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 59: 165-174, 2007.
- LORIAN V. ERNST J. Effects of antibiotics on bacterial structure and their pathogenicity. **Pathology Biology**, v.35, p.1370-1376, 1987.
- MABILAT, C. e GOUSSARD, S. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases, p.553-559. In: D.H. Persing et al. (ed.), **Diagnostic molecular microbiology: principles and application**. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993.
- MÁTHÉ ANDRÁS; DORA SZABO; PIROSKA ANDERLIK; FERENC ROZGONTYI, KÁROLY NAGY. The effect of amikacin and imipenem alone and in combination against an extended spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. **Diagnostic Microbiology and infectious disease**. 2007. In press.
- MCPHERSON D. L.; POPHAM D. L. Peptidoglycan synthesis in the absence of class A penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**. v. 185, N 4. p. 1423-1431.
- MUNDAY, C.J.; WHITEHEAD, G.M.; TODD, N.J.; CAMPBELL, M.; HAWKEY, P.M. Predominance

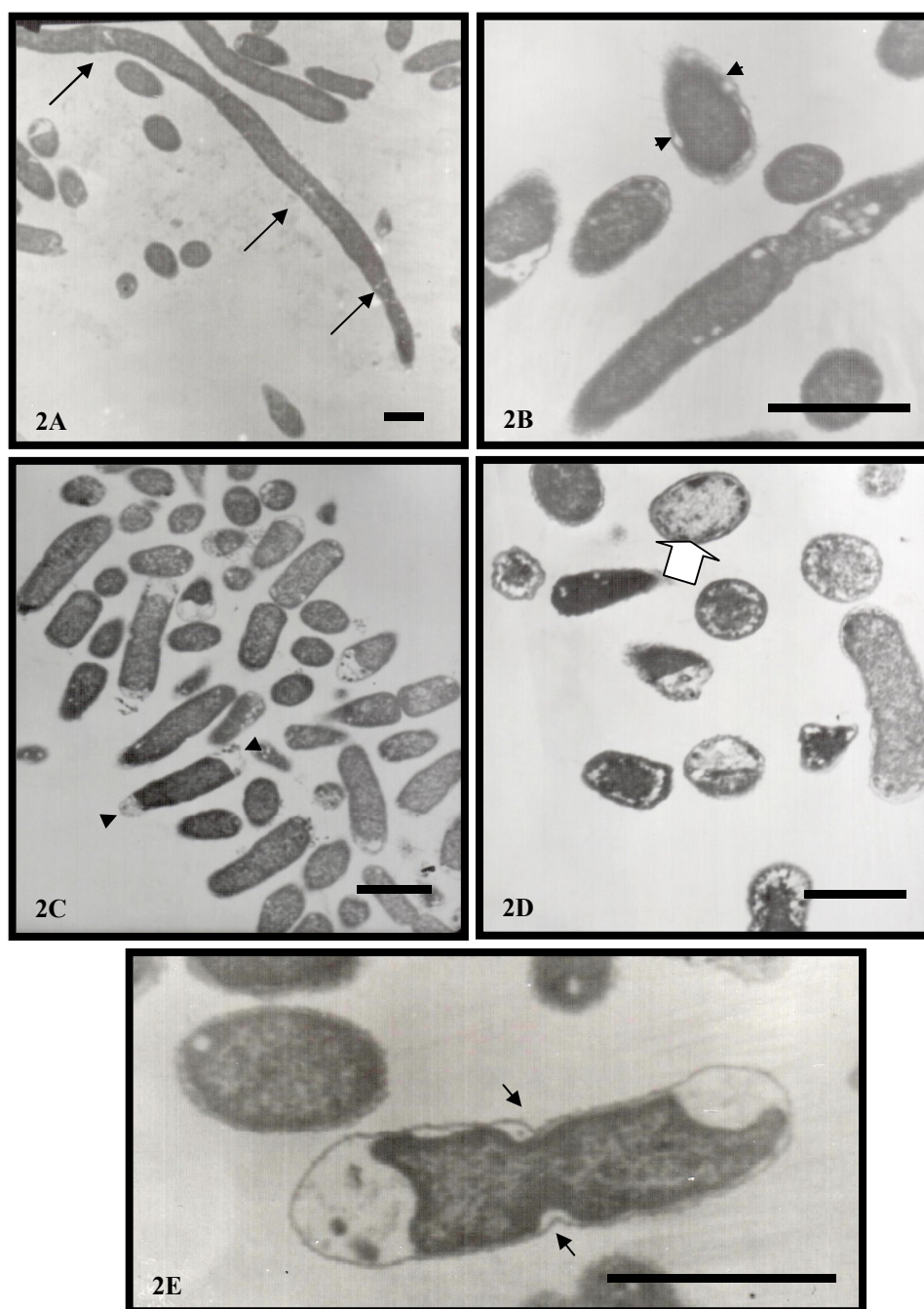
- and genetic diversity of community - and hospital - acquired CTX-M extended-spectrum β -lactamases in York, UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 54, p. 628-633, 2004.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 7.ed. Approved Standard, M7-A7 NCCLS, Wayne, PA, 2006.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. M100-S17 NCCLS, Vol. 27 N° 1, 2007.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS.. Perfomance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; 6th ed. M2A6. National Commitee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.1997.
- NELSON, E.C.; HEIDI SEGAL AND . ATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS.. Perfomance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; 6th ed. M2A6. National Commitee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.1997.
- PAGANI LAURA; EMANUELA DELL AMICO; ROBERTA MIGLIAVCCA; MARCO MARIA D' ANDREA; ERNESTO GIACOBONE; GIANFRANCO AMICOSANTE; EGIDIO ROMERO AND GIAN MARIA ROSSOLINI. Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in Northern Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.4264-4269, 2003.
- PAI, H.; LYU, S.; HYANG LEE, J.; KIM, J.; KWON, Y.; KIM, J.W.; CHOE, K.W. Survey of extend-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1758-1763, 1999.
- PATRÍCIA A BRADFORD. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, Epidemiology, and Detection of this Important Resistance Threat. **Clinical Microbiology Reviews**. v.14, p. 933-951. 2001.
- PERILLI M.; GIUSEPPE C.; MARIANNA F.; BERNARDETTA S.; CRISTINA P.; FRANCESCO L.; GIAN M. R.; GIANFRANCO A. Biochemical analysis of TEM-134, a new TEM-type extended-spectrum β -lactamase variant produced in a *Citrobacter koseri* clinical isolate from an Italian hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 60, p. 877-880, 2007.
- PRABHA LAL; ARTI KAPIL; BIMAL K.; DAS & SEEMA SOOD. Occurrence of TEM & SHV gene in extended spectrum β -lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella* sp. Isolated from a tertiary care hospital. **Indian J Med Res**. v. 125. P. 173-178, 2007.

- QUINTEROS, M.; RADICE, M.; GARDELLA, N.; RODRÍGUEZ, M.M.; COSTA, N.; KORBENFELD, D.; COUTO, E.; GUTKIND, G.; MICROBIOLOGY STUDY GROUP. Extended-Spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 47: 2864-2867, 2003.
- RASHEED J. K.; GREGORY J.A.; HESNA Y.; ANNE MARIE Q.; ANTONIO DOMÉNECH-SÁNCHEZ; JANA M. S.; JAMES W. B.; MARY JANE F.; GEORGE A. JACOBY; FRED C. TENOVER. Characterization of the Extended-Spectrum β -lactamase Reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which Produces the novel enzyme SHV-18. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**. v. 44. p. 2382-2388, 2000.
- RICE L. B.; L.L. CARIAS; A.M. HUIJER; M. BONAFEDE; R. HUTTON; C. HOYEN; R.A. BONOMO. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 β -lactamase and an piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**. v. 44. p. 362-367, 2000.
- ROBIN F.; JULIEN D.; CÉDRIC S.; OLIVIER T.; OLIVIER L.; CATHERINE C.; RICHARD B. Evolution of TEM-type enzymes: biochemical and genetic characterization of two new complex mutant TEM enzymes, TEM-51 and TEM-52, from a single patient. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.51, N4 p.1304-1309, 2007.
- SALADIN M.; VAN THI BAO CAO; THIERRY LAMBERT; JEAN-LUC DONAY; JEAN-LOUIS HERRMAN; ZAHIA OULD-HOCINE; CHARLOTTE VERDET; FRANÇOISE DELISLE, ALAIN PHILIPPON; GUILLAUME ARLET. Diversity of CTX-M β -lactamase and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. **FEMS Microbiology Letters**. V.209. p. 161-168, 2002.
- SANDERS, C.C., AND W. E. SANDERS JR. B-lactamase in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. **Clin. Infect. Dis.** 15:824–839, 1992.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.74, p.5463-5467, 1977.
- SOUZA LOPES A. C.; FALCÃO RODRIGUES J. DE MORAIS JÚNIOR M.A. NMolecular Typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. **Microbiological Research**. v. 160, N1, p.37-46.
- SPRATT, B. G. Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.72, p.2999-3003, 1975.
- STÅLE TOFTELAND; BJORG H.; KRISTIN H. D.; GUNNAR S.; S.; MARTIN S.; TIMOTHY R. W.; ARNFINN S. AND NORWEGIAN ESBL STUDY GROUP. Effects of phenotype and genotype on methods for detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing clinical isolates of

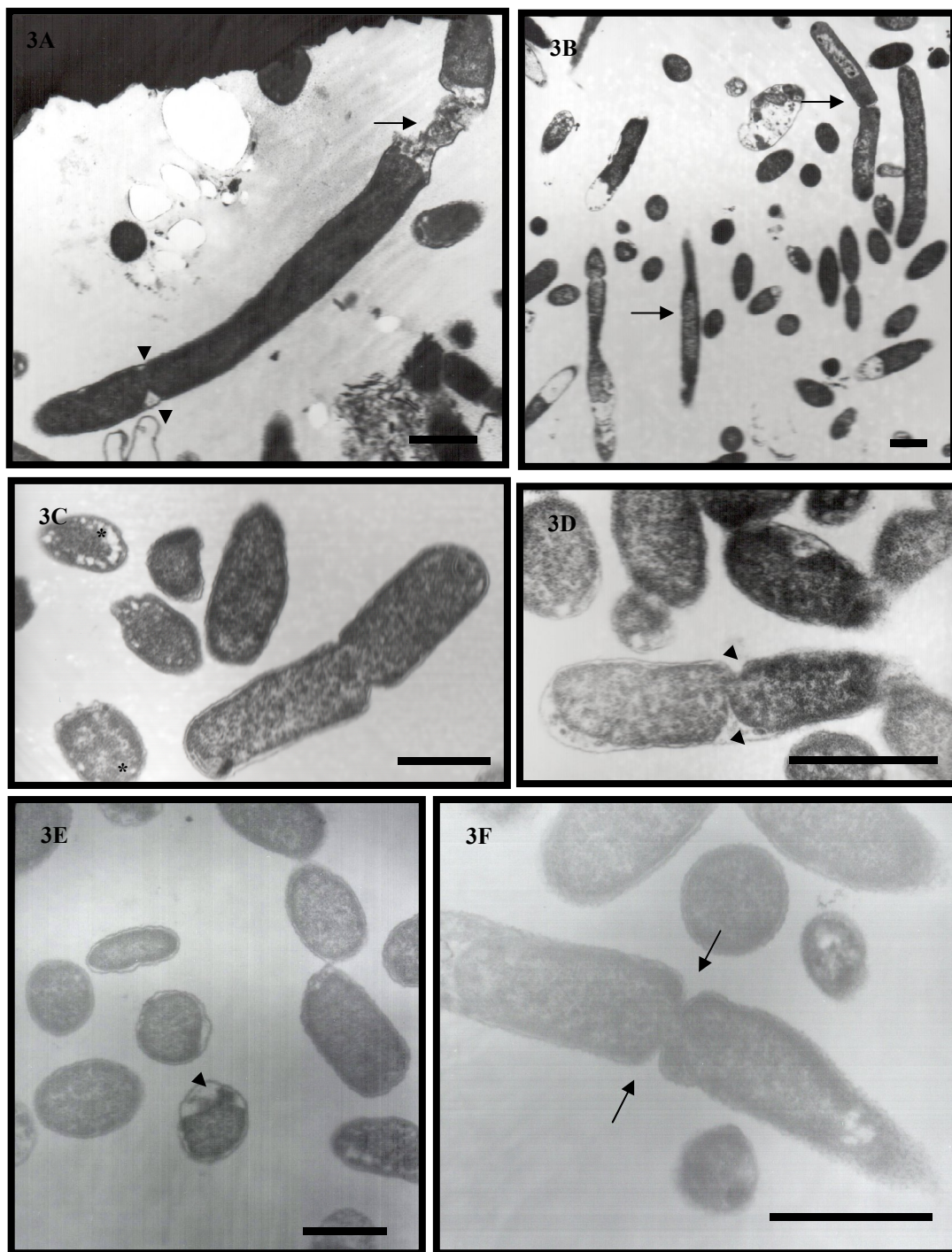
- Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, p. 199-205.
- STEFANOVA E. M.; TOMBERG J.; OLESKY M.; HÖLTJE J. V.; GUTHEIL W. G.; NICHOLAS R. A. *Neisseria gonorrhoeae* penicillin-binding protein 3 exhibits exceptionally high carboxypeptidase and β -lactam binding activities. **Biochemistry**. v. 42, p. 14614-14625.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. (Eds.) **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 586 p.
- TZOUVELEKIS, L.S., E. TZELEPI, P.T. TASSIOS, AND N. J. LEGAKIS, 2000. CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. **Int. J. Antimicrobial Agents** 14: 137-142.
- VERAS D. L.; SOUZA LOPES A. C.; MORAIS JÚNIOR M. A. Estudo Molecular e fenotípico de fatores de resistência a antimicrobianos em isolados de *Klebsiella pneumoniae*. 2007. Dados não publicados.
- VILLEGAS, MARIA VIRGINIA; CORREA, ADRIANA; PEREZ, FEDERICO; ZULUAGA, TANIA; RADICE, MARCELA; GUTKIND GABRIEL; CASELLAS, JOSÉ MARIA; AYALA, JUAN; LOLANS, KAREN; QUINN, JOHN P AND THE COLOBIAN NOSOCOMIAL RESISTANCE STUDY GROUP. CTX-M-12 β -lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate in Colombia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v.48, p. 629-631, 2004.
- WILLIAMS, PAUL. Sub-MICs of cefuroxime and ciprofloxacin influence interaction of complement and immunoglobulins with *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.31, p. 758-762, 1987.
- WU T.L.; L.K. SIU; L.H. SU; T.L. LAUDERDALE, F.M. LIN; H. S. LEU; T.Y. LIN; AND M. HO. Outer membrane protein change combined with co-existing TEM-1 and SHV-1 β -lactamases lead to false identification of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal antimicrobial and chemotherapy**, v.47, p. 755-761, 2001.



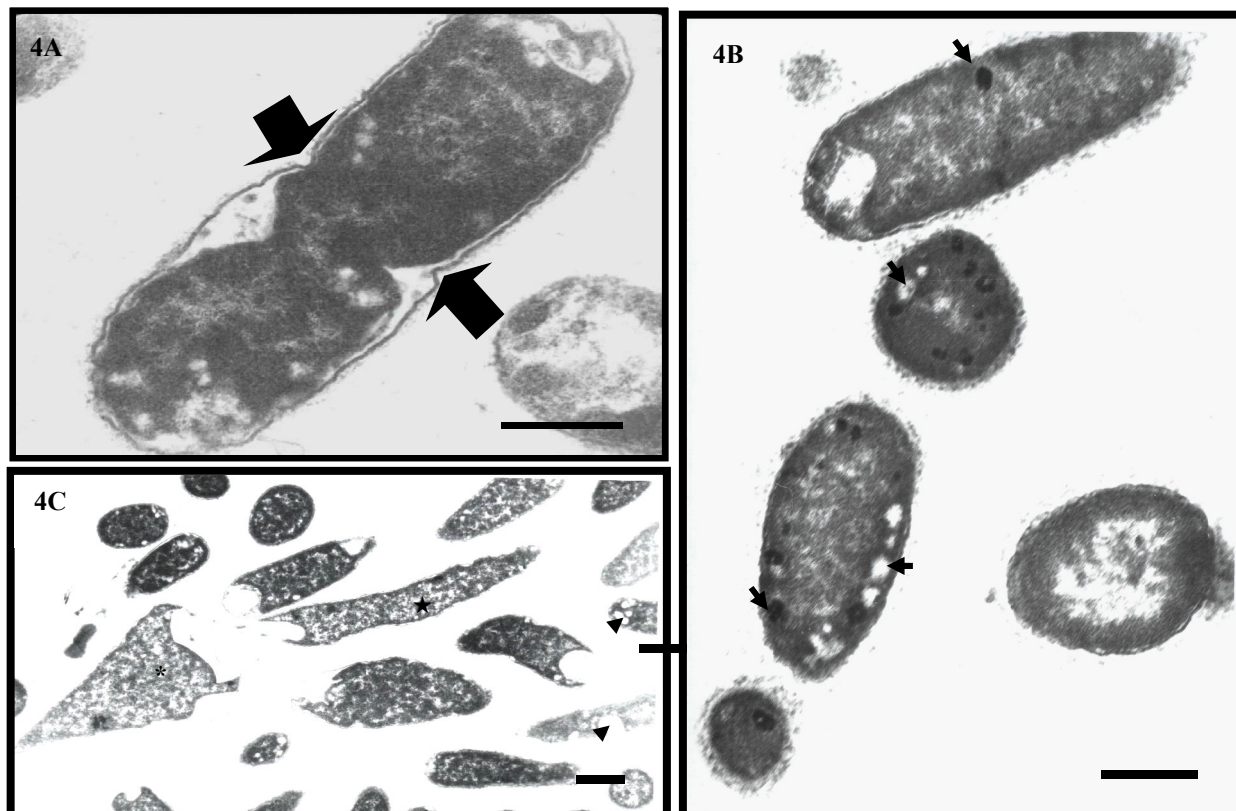
Figuras 1 (A-B) – Eletromicrografias de MET de células controle dos isolados K21.1-F e K16R de *Klebsiella pneumoniae*. **A** - Célula apresentando morfologia conservada com presença de Membrana externa (pontas de setas), Parede celular íntegra (seta longa) e membrana interna (seta larga). **B** - Célula em processo de divisão celular. Observe formação de septo regular (setas). Barras = 0,5 μm .



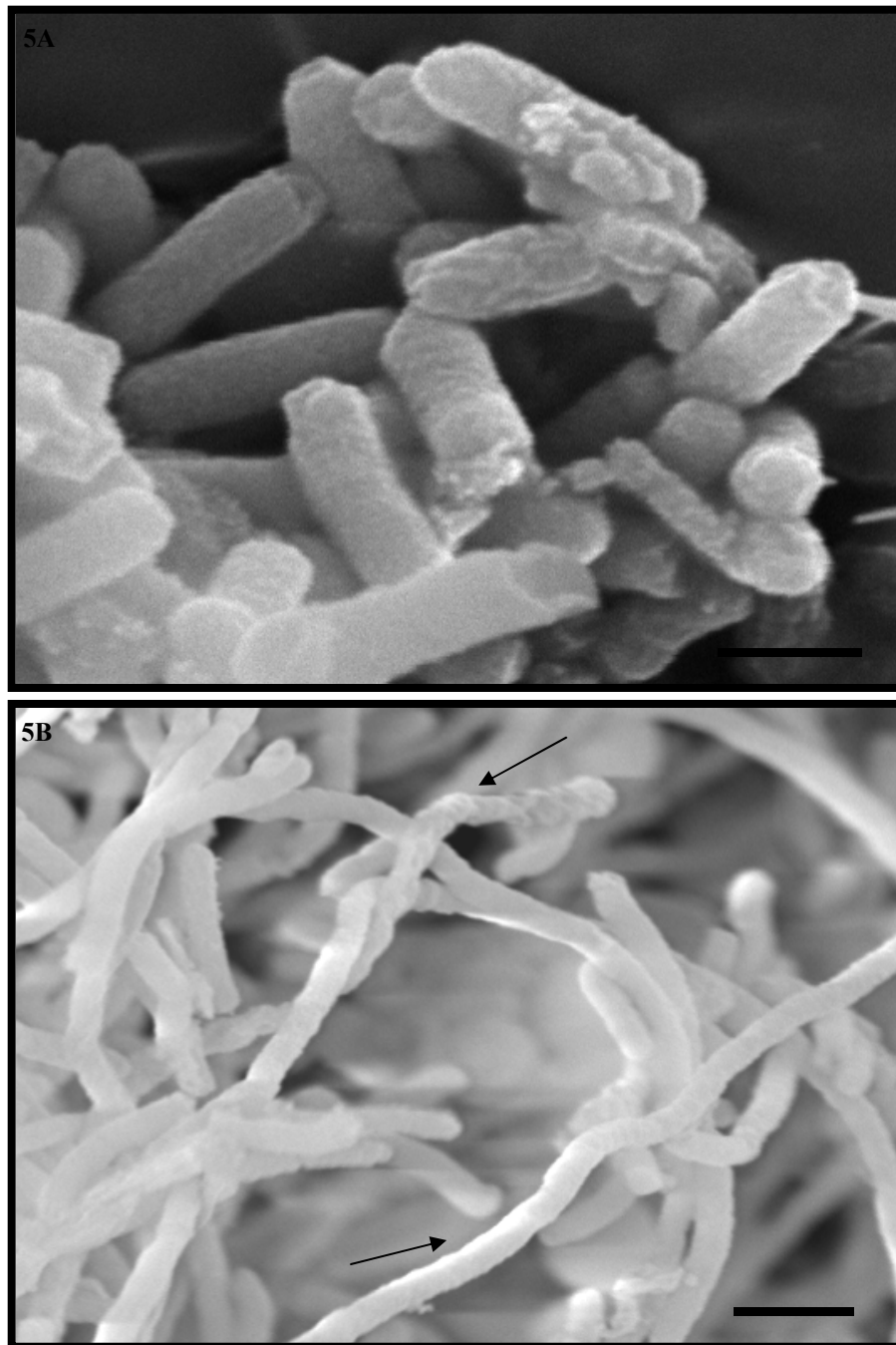
Figuras 2 (A-E) – Eletromicrografias de MET de células do isolado K3C de *Klebsiella pneumoniae*. **A-B** – células submetidas a 32µg/ml de ceftazidima. As células se apresentam alongadas e em processo de divisão consecutiva sem conclusão. Ver formação de vários septos no decorrer da célula (setas) e formação de membrana blebbing (pontas de setas). **C** – células submetidas a 16 µg/ml de aztreonam. As células apresentam estruturas eletrônicas ao longo na periferia do citoplasma (pontas de setas). **D-E** – células submetidas a 32 e 64 µg/ml de cefotaxima, respectivamente. A seta longa indica a presença de espaços eletrônicos no citoplasma indicando perda de material citoplasmático. Observar formação irregular de septos durante a divisão celular (setas curtas). Barras = 0,5 µm.



Figuras 3 (A-F) – Eletromicrografias de MET de células do isolado K16R de *Klebsiella pneumoniae*. **A-B** – células submetidas a 8 µg/ml de ceftazidima. As células se apresentam alongadas (setas) e em processo de divisão consecutiva sem conclusão. Ver formação de vários septos no decorrer da célula (pontas de setas). **C-D** – células submetidas a 64 µg/ml de cefotaxima. As células apresentam estruturas eletróluscentes ao longo do citoplasma (asterisco) e formação irregular de septos (pontas de setas). **E-F** – células submetidas a 4 µg/ml de aztreonam. As pontas de setas indicam a presença de espaços eletróluscentes no citoplasma celular e as setas indicam a formação regular de septos. Barras = 0,5 µm.



Figuras 4 (A-C) – **A** – Eletromicrografia de MET de células do isolado K21.1-F de *Klebsiella pneumoniae* submetido a concentração de 0,5 µg/ml ampicilina. Observe formação irregular de septos em uma célula em divisão (setas largas). **B** - Eletromicrografia de células do isolado K58.1-F *Klebsiella pneumoniae* submetido a 0,5 µg/ml de ampicilina. As células apresentam estruturas eletronluscentes e eletrondensas com forma e tamanhos variados espalhados pelo citoplasma da célula (pontas de setas). **C** – Eletromicrografia de células do isolado K58.1-F submetido a 4µg/ml de amoxicilina. As células apresentam morfologias alteradas com alongamento celular (estrela) e formas indefinidas (asterisco), com peresença de estruturas eletronluscentes com forma e tamanhos variados espalhados pelo citoplasma da célula (pontas de setas). Barras = 0,5



Figuras 5 (A-B) – Eletromicrografias de MEV de células do isolado K3C de *Klebsiella pneumoniae*. **A** – Observe que as células apresentam morfologia conservada e comprimento celular normal. **B** - Células submetidas a 32 μ g/ml de ceftazidima em processo de divisão celular. Observe formação de células filamentosas (setas). Barras = 1,0 μ m (A) e 2,0 μ m (B).

Tabela 1. Origem e perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados de *K. pneumoniae* analisados no presente trabalho.

<i>Isolado^(a)</i>	<i>Origem</i>	<i>Fonte de isolamento</i>	<i>Perfil de resistência a antimicrobianos β-lactâmicos^(b)</i>	<i>ESBL^(c)</i>
K10-R, K6-R, K13-R*	Hospitalar	Secreção respiratória	AMP,AMO,CTX(Int.)	Neg.
K15-R	Hospitalar	Sangue	AMP,AMO,AMC,CTX,CP	Neg.
K16-R*	Hospitalar	Urina	AMP,AMO, AMC(Int.),ATM,CTX CP	Pos.
K17-R, K14-R	Hospitalar	Secreção Respiratória	AMP,AMO	Neg.
K20-R,K3-C*, K19-R*, K16-C*	Hospitalar	Urina	AMP,AMO,CTX(Int.)	Neg.
K7-C	Hospitalar	Urina	AMP,AMO,CTX(Int.)	Neg.
K10-C*	Hospitalar	Urina	AMP,AMO,AMC(Int.),ATM, CAZ(Int.),CTX(Int.)	Neg.
K11-C, K8-C, K11-R, K18-R, K2-R, K17-C	Hospitalar	Urina	AMP,AMO	Neg.
K12-C	Hospitalar	Urina	AMP,AMO,CTX(Int.)	Pos.
K13-C	Hospitalar	Ferida	AMP,AMO,CTX,CP	Pos.
K14-C*	Hospitalar	Ferida	AMP,AMO,CTX(Int.)	Neg.
K15-C	Hospitalar	Urina	AMP,AMO, CTX(Int.),CP(Int.)	Pos.
K18-C	Hospitalar	Urina	AMP,AMO,CP	Pos.
K3-CM*	Comunidade	Urina	AMP,AMO, AMC,CAZ, CTX	Pos.
K4-CM, K6-CM, K8-CM, K10-CM, K12-CM	Comunidade	Urina	AMP,AMO	Neg.
K9-CM	Comunidade	Urina	AMP,AMO,ATM(Int.)	Neg.
K11-CM	Comunidade	Urina	AMP,AMO,AMC,CAZ(Int.), ATM	Pos.
K22-ORO	Microbiota normal	Secreção de orofaringe	AMP,AMO	Neg.
K3.2-F, K58.2-F, K63.1-F, K68-F, K6.3-F, K58.3-F, K7.1-F	Microbiota normal	Fezes	AMP,AMO	Neg.
K10.1-F, K24.2-F, K51.1-F, 21.2-F, K7.2-F, K13.3-F, K63.2-F, K10.2-F	Microbiota normal	Fezes	AMP,AMO	Neg.
K3.1-F, K24.1-F	Microbiota normal	Fezes	Sens. AMP,AMO	Neg.
21.1-F, 58.1-F	Microbiota normal	Fezes	AMO(Int.)	Neg.

^(a) Identificação dos isolados bacterianos: -R, Hospital da Restauração –PE; -C, Hospital das Clínicas da UFPE; -CM, isolados de infecções na comunidade; -ORO, isolado da microbiota normal da orofaringe; -F, isolados da microbiota normal de fezes.

^(b) AMP, Ampicilina; AMO, Amoxicilina; ATM, Aztreonam; CAZ, ceftazidima; AMC, Amoxicilina - Clavulanato; CTX, Cefotaxima; CP, Cefoperazona; Int., Intermediário.

^(c) ESBL, teste de sinergia de disco duplo (Veras *et al.*, 2007; Souza Lopes *et al.*, 2005)

* Isolados seqüenciados para o gene *bla*_{SHV}.

Tabela 2. Primers utilizados nas amplificações por PCR e seqüenciamento dos genes CTX-M.

Primer	Seqüência do primer (5' - 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Posição do Primer	Referência
CTX-M1-F CTX-M1-R	CGCTTTGCGATGTGCAG ACCGCGATATCGGTTGGT	61	202-218 736-752	Villegas et al. (2004)
CTX-M13U CTX-M13L	GGTTAAAAAATCACTGCGTC TTGGTGACGATTTTAGCCGC	60	65-84 909-928	Saladin et al. (2002)
CTX-M25U CTX-M25L	ATGATGACTCAGAGCATTCG TGGGTTACGATTTTCGCCGC	62	6-25 852-871	Saladin et al. (2002)
CTX-M8-IF1 CTX-M8-IR1	ACGAACTGGGTGTGGCGTTG TGTCATCGTGCCATTGACGTG	60	138-156 343-363	Este estudo
CTX-M9U CTX-M9L	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA CCCTTCGGCGATGATTCTC	60	112-131 957-975	Saladin et al. (2002)
CTX-M-G25-F CTX-M-G25-R	CCGTCGGTGACAATTCTGGC AGAAAAAGCGTAAGGCGGGC	60	7-26 850-859	Este estudo

Tabela 3. Sub-MICs de amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, ceftazidima e aztreonam, determinados pelo teste de macrodiluição em caldo em isolados de *K. pneumoniae*, para utilização no processamento pela Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura.

Isolado^(a)	Sub-MICs de amoxicilina (µg/ml)	Sub-MICs de ampicilina (µg/ml)	Sub-MICs de cefotaxima (µg/ml)	Sub-MICs de ceftazidima (µg/ml)	Sub-MICs aztreonam (µg/ml)
K58.1-F (MET)	0,5 ; 4,0 ; 16	0,5 ; 8,0	--	--	--
K24.1-F (MET)	0,5 ; 2,0	0,5	--	--	--
K21.1-F (MET)	0,5 ; 16 ; 64 ; 128	0,5 ; 16 ; 32 ; 64	--	--	--
K3.1-F (MET)	0,5 ; 4,0	2,0 ; 4,0	--	--	--
K3C (MET)	--	--	64; 32	32; 16	32; 16
K16R (MET)	--	--	64; 32	16; 8	4
K3C (MEV)	--	--	32	32	32
K16R(MEV)	--	--	32	16	4

^(b) Identificação dos isolados bacterianos: C, Hospital das Clínicas da UFPE; R, Hospital da Restauração-PE; -F, microbiota normal de fezes. MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão; MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura; --, MIC não determinado.

Tabela 4. Presença dos genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* em 52 isolados de *K. pneumoniae* provenientes da microbiota normal, infecções nosocomiais e na comunidade.

Isolado ^(a)	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	Isolado ^(a)	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{TEM}</i>
K 2R	+	+	K6CM	+	-
K6R	-	-	K8CM	+	-
K10R	-	+	K9CM	-	-
K11R	-	+	K10CM	-	-
K13R*	+	+	K11CM	+	-
K14R	+	+	K12CM	-	+
K15R	+	+	K22ORO	+	-
K16R*	+	+	K3.1F	-	-
K17R	+	-	K3.2F	-	-
K18R	+	+	K6.3F	-	-
K19R*	+	+	K7.1F	-	-
K20R	+	+	K7.2F	+	-
K3C*	+	+	K10.1F	-	+
K7C	-	+	K10.2F	+	-
K8C	+	+	K13.3F	-	+
K10C*	+	+	K21.1F	-	+
K11C	+	-	K21.2F	+	-
K12C	-	-	K24.1F	-	-
K13C	-	-	K24.2F	+	-
K14C*	+	+	K51.1F	-	-
K15C	-	-	K58.1F	-	-
K16C*	+	+	K58.2F	+	-
K17C	+	+	K58.3F	+	-
K18C	-	+	K63.1F	+	-
K3CM*	+	+	K63.2F	-	-
K4CM	-	ND	K68F	+	+

^(a) Identificação dos isolados bacterianos: -R, Hospital da Restauração –PE; -C, Hospital das Clínicas da UFPE; -CM, isolados de infecções na comunidade; -ORO, isolado da microbiota normal da orofaringe; -F, isolados da microbiota normal de fezes. * Isolados seqüenciados para o gene *bla_{SHV}*. ND - Não determinado.

Tabela 5. MICs de cefotaxima, ceftazidima e aztreonam e presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M2} em isolados de *K. pneumoniae* (n=19) provenientes de infecções hospitalares e na comunidade em Recife-PE.

<i>Isolado</i> ^(a)	<i>MIC de cefotaxima</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>MIC de ceftazidima</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>MIC de aztreonam</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>SHV</i>	<i>TEM</i>	<i>CTX-M2</i>
K6R	<0,5	1	<0,5	-	-	-
K10R	<0,5	1	<0,5	-	+	-
K13R	1	1	<0,5	+	+	-
K15R	<0,5	2	<0,5	+	+	-
K16R	>256	32	16	+	+	+
K19R	<0,5	1	<0,5	+	+	-
K20R	<0,5	1	<0,5	+	+	-
K3C	>256	128	64	+	+	-
K3CM	>256	64	64	+	-	+
K9CM	<0,5	1	<0,5	-	-	-
K11CM	>256	64	256	+	-	+
K7C	<0,5	1	<0,5	-	+	-
K10C	<0,5	1	<0,5	+	+	-
K12C	<0,5	4	1	-	-	-
K13C	<0,5	1	<0,5	-	-	-
K14C	<0,5	1	2	+	+	-
K15C	<0,5	2	2	-	-	-
K16C	<0,5	1	<0,5	+	+	-
K18C	<0,5	4	<0,5	-	+	-

^(a) Identificação dos isolados bacterianos: -R, Hospital da Restauração –PE; -C, Hospital das Clínicas da UFPE; -CM, isolados de infecções na comunidade.

Tabela 6. MICs de ampicilina e amoxicilina de isolados de *K. pneumoniae* provenientes da microbiota normal de fezes e presença dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}.

<i>Isolado^(a)</i>	<i>MIC de amoxicilina (µg/ml)</i>	<i>MIC de ampicilina (µg/ml)</i>	<i>Presença do gene bla_{SHV}</i>	<i>Presença do gene bla_{TEM}</i>
K58.1-F	32	16	-	-
K24.1-F	4,0	1,0	-	-
K21.1-F	> 128	128	-	+
K3.1-F	8,0	8,0	-	-

Tabela 7. Características das enzimas SHV detectadas em isolados de *K. pneumoniae* provenientes de infecções hospitalares e na comunidade.

Isolado ^(a)	SHV tipo	Mudança de aminoácido ^(b)	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^(c)		
			CTX	CAZ	ATM
K3C	SHV-1a	L31Q	>256	64	64
K10C	SHV-1a	L31Q	<0,5	1	<0,5
K14C	SHV-108	L31Q, T136I	<0,5	1	2
K16C	SHV-28	Y3F	<0,5	1	<0,5
K13R	SHV-1	S/A	1	1	<0,5
K16R	SHV-1	S/A	>256	32	16
K19R	Nova variante	L31Q, R160P, W161P, E162G, ins.163G	<0,5	1	<0,5
K3CM	SHV-1	S/A	>256	64	64

^(a) Identificação dos isolados bacterianos: -R, Hospital da Restauração –PE; -C, Hospital das Clínicas da UFPE; -CM, isolados de infecções na comunidade.

^(b) Mudanças de aminoácidos relatada em relação a SHV-1. S/A-Sem alterações.

^(c) Determinados por microdiluição em caldo. CAZ, ceftazidima; ATM, Aztreonam; CTX, Cefotaxima

6.0 CONCLUSÕES

- A ocorrência dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} foi maior que a ocorrência do gene *bla*_{CTX-M} em isolados de *K. pneumoniae* obtidos de infecções hospitalares e na comunidade provenientes de Recife-PE;
- Houve uma maior ocorrência do gene *bla*_{SHV-1} em isolados de *K. pneumoniae* obtidos de infecções nosocomiais e na comunidade do que os outros tipos de SHV encontradas (*SHV-1A*, *SHV-28* e *SHV-108*);
- Uma nova variante da família SHV foi encontrada possuindo mutações diferentes das enzimas SHV já descrita, não proporcionando aumento, porém, do espectro hidrolítico da enzima;
- Houve uma maior resistência dos isolados portadores do gene *bla*_{SHV-1} a cefaloporinas de terceira geração e ao aztreonam do que nos isolados portadores de variantes SHV;
- Todos os isolados portadores do gene *bla*_{CTX-M2} foram resistentes a cefotaxima e ceftazidima;
- Dois isolados de *K. pneumoniae* obtidos de microbiota normal foram sensíveis a ampicilina, não apresentando os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM};
- Apesar do isolado K3C ser portador do gene *bla*_{SHV-1} e *bla*_{TEM} e do isolado K16R dos genes *bla*_{SHV-1}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M2} estes apresentaram muitas alterações ultra-estruturais quando submetidos aos diferentes Sub-MICs dos antimicrobianos testados;
- Nossos resultados sugerem que isolados de *K. pneumoniae* portadores de diferentes β -lactamases e resistentes a diferentes antimicrobianos podem sofrer alterações ultra-estruturais significativas quando submetidos a Sub-MICs da droga, o que poderia possibilitar uma melhor atuação do sistema imune de um paciente infectado com esta espécie bacteriana.

7.0 REFERÊNCIAS

- ANDREA RAHN; KOSTANTINOS BEIS. JAMES H. NAISMITH; CHRIS WHITFIELD. A Noval outer membrane protein, Wzi, is involved in surface assembly of the Escherichia coli K30 Group 1 capsule. **Journal of Bacteriology**, v.185, N19, p.5882-5890, 2003.
- BIEDENBACH D.J.; MOET G.J.; JONES R. N. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). **Diagnostic Microbiology and infectious disease**, v. 50, N1, p. 59-69, 2004.
- BONNET, R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48: 1-14, 2004.
- BONNET, R.; DUTOR, C.; SAMPAIO, J.L., CHANAL, C.; SIROT, D.; LABIA, R.; DE CHAMPS, C.; SIROT, J. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240→Gly. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 45: 2269-2275, 2001.
- BUSH, K.; JACOBY, G.A; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.1211-1223, 1995.
- BUSH L., JOHNSON C. C. Antibacterial therapy: ureidopenicillins and β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. **Infect. Dis. Clin. North Am.** Vol. 14, No. 2, p. 1-23, 2000.
- CANICA, M. M.; MENDONÇA, N. First description of the 6 new enzymes SHV in isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Portugal. 2007. Dados não publicados.
- CAO VAN; THIERRY LAMBERT; DUONG QUYNH NHU; HUYNH KIM LOAN; NGUYEN KIM HOANG; GUILLAUME ARLET AND PATRICE COURVALIN. Distribution of Extended-Spectrum β -lactamases in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.3739-3743, 2002.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from january 1992 through june 2003, issued August 2003. **American Journal of Infection Control**, v.31, p.481-489, 2003.
- CHANAWONG, A.; M'ZALI, F.H.; HERITAGE, G.; XIONG, J.H.; HAWKEY, P.M. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the people's Republic of China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p. 630-637, 2002.
- CHAVES, J.; MARGARITA G.L.; CONCEPCIÓN S.; AMPARO C.; ROSER R.; CORAL A. SHV-1 β -Lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella*

- pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.2856-2861, 2001.
- COQUE T.M.; OLIVER A.; PÉREZ-DÍAZ J.C.; BAQUERO F. CANTÓN R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, (1989 to 2000). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, N2, p.500-510, 2002.
- CURTIS N. A. C.; D. ORR; G. W. ROSS; M. G. BOULTON. Competition of β -lactam antibiotics for the penicillin-binding proteins of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus rettgeri*, and *Escherichia coli*: Comparison with antibacterial activity and effects upon bacterial morphology. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.16, p.325-328.
- DE CHAMPS, C.; ROUBY, D.; GUELON, D.; SIROT, J.; SIROT, D.; BEYTOUT, D.; GOURGAND, J.M. A case-control study of an outbreak of infection caused by *Klebsiella pneumoniae* strains producing CTX-1 (TEM-3) β -lactamase. **Journal of Hospital Infection**, v.18, p.5-13, 1991.
- DELONEY, CINDY R.; NEAL SCHILLER. GCompetition of various β -lactam antibiotics for the major penicillin-binding proteins of *Helicobacter pylori*: Antibacterial activity and effects on bacterial morphology. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, N11, p.2702-2709, 1999.
- DERRELL C. MCPHERSON AND DAVID L. POPHAM. Peptidoglycan synthesis in the absence of class A penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v.45, N4, p. 1423-1431, 2003.
- ESSACK, S. Y.; HALL L.M.; PILLAY D.G.; MCFADYEN M.L.; LIVERMORE, D.M.; Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, N1, p.88-95, 2001.
- ELTAHAWY, A.T. Gram-negative bacilli isolated from patients in intensive care unit: prevalence and antibiotic susceptibility. **Journal of Chemotherapy**, v.9, p.403-410, 1997.
- GALES, A. C.; PIGNATARI, A.C.; JONES, R.N.; BARRETA, M.; SADER, H.S. Evaluation of in vitro activity of new fluoroquinolones, cephalosporins and carbapenems against 569 gram-negative bacteria. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.42, p.137-144, 1997.
- GARCIA DDE O.; DOI Y.; SZABO D.; ADAMS-HADUCH J. M.; VAZ T. M.; LEITE D.; PADOVEZE M. C.; FREIRE M. P.; SILVEIRA F. P.; PATERSON D. L. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-

- M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, N5 p.1790-1793. 2008.
- GOODMAN & GILMAN. As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 10. ed., **Mac Graw Hill**, 2003.
- HAEGGMAN S, LOFDAHL S, BURMAN LG. An allelic variant of the chromosomal gene for class A β -lactamase K2, Specific for *Klebsiella pneumoniae*, is the ancestor of SHV-1. **Antimicrob Agents Chemother** 1997; 41:2705-2709.
- HAEGGMAN S, LOFDAHL S, PAAUW A.; VERHOEF J. ; BRISSE S. Diversity and Evolution of the Class A Chromosomal β -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 2400-2408, 2004.
- HELD T. K.; ADAMCZIK C.; TRAUTMANN M.; CROSS A. 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. 1093-1096, 1995.
- HOLTEN KB, ONUSKO EM. Clinical pharmacology: appropriate prescribing of oral β -lactam antibiotics. **Am. J. Med. Physica**, Vol. 62, No. 3, p. 1-12, 2000.
- HSUEH, P.; LIU, C.; LUH, K. Current status of antimicrobial resistance in Taiwan. **Emerging Infectious Diseases**, 8: 132-137, 2002.
- JEONG, S.H.; BAE, I.K.; LEE, J.H.; SOHN, S.G.; KANG, G.H.; JEON, G.J.; KIM, Y.H. *et al.* Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean Nationwide survey. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p. 2902-2906, 2004.
- JACOBY, GEORGE A. β -lactamase Nomenclature. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50. p. 1123-1129. 2006.
- K. D. TRIPATHI. Farmacologia Médica. 5ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2006.
- KAREN BUSH. New β -lactamases in gram-negative bacteria: Diversity and Impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p.1085-1089, 2001.
- KIFFER, C.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C.; SAMPAIO, J.; SAKAGAMI, E.; TURNER, C.M.; MYSTIC BRAZIL GROUP. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian Hospitals: The MYSTIC Program Brazil 2003. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.9, p.216-224, 2005.
- KINGSLEY, J. D.; VERGHESE, S. rSHV-28, a chromosomal encoded-extended spectrum β -lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in south India. 2008. Dados não publicados.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDRA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C.

- Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido.** 5. Ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica, 2001. 1465p.
- LEGAREE B. L.; CALVIN B. A.; ANTHONY J. C.; Overproduction of penicillin-binding protein 2 and its inactive variants causes morphological changes and lysis in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.189, N14, p.4975-4983, 2007.
- LI, L.; LIM, C.K. A novel large plasmid carrying multiple β -lactam resistance genes isolated from a *Klebsiella pneumoniae* strain. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.1038-1048, 2000.
- LIVERMORE, D.M.; CANTON, R.; GNIADKOWSKI, M.; NORDMANN, P.; ROSSOLINI, G.M.; ARLET, G.; AYALA, J.; COQUE, T.M.; KERN-ZDANOWISZ, I.; LUZZARO, F.; POIREL, L.; WOODFORD, N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 59: 165-174, 2007.
- LORIAN V. ERNST J. Effects of antibiotics on bacterial structure and their pathogenicity. **Pathology Biology**, v.35, p.1370-1376, 1987.
- LOLANS, KAREN; QUINN, JOHN P. AND THE COLOMBIAN NOSOCOMIAL RESISTANCE STUDY GROUP. CTX-M-12 β -lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in Colômbia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v.48, p.629-631, 2003.
- LYE, W.C.; CHAN, R.K.T.; LEE, E.J.C.; KUMARASINGHE, G. Urinary tract infections in patients with diabetes mellitus. **Journal of Infections**, v.24, p.169-174, 1992.
- MABILAT, C. e GOUSSARD, S. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases, p.553-559. In: D.H. Persing et al. (ed.), **Diagnostic molecular microbiology: principles and application**. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Laboratory Press, 1982. p.368-369.
- MÁTHÉ ANDRÁS; DORA SZABO; PIROSKA ANDERLIK; FERENC ROZGONTYI, KÁROLY NAGY. The effect of amikacin and imipenem alone and in combination against an extended spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. **Diagnostic Microbiology and infectious disease**. 2007. In press.
- MCPHERSON D. L.; POPHAM D. L. Peptidoglycan synthesis in the absence of class A penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**. v. 185, N 4. p. 1423-1431, 2002.
- MICHÉLE SALADIN; VAN THI BAO CAO; THIERRY LAMBERT; JEAN-LUC DONAY; JEAN-LOUIS HERRMAN; ZAHIA OULD-HOCINE; CHARLOTTE VERDET; FRANÇOISE DELISLE, ALAIN

- PHILIPPON; GUILLAUME ARLET. Diversity of CTX-M β -lactamase and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. **FEMS Microbiology Letters**. V.209. p. 161-168, 2002.
- MINARINI, L.A.; CLÍMACO, E.C.; GUIMARÃES, D.B.; FERREIRA, J.C.; PALAZZO, I.C.; MARTINEZ, R.; DARINI, A.L. Clonal Transmission of ESBL-Producing *Klebsiella* spp. at a University Hospital in Brazil. **Current Microbiology**, v.56, p.587-591, 2008.
- MINARINI LA, GALES AC, PALAZZO IC, DARINI AL. Prevalence of community-occurring extended spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Current Microbiology**, 54: 335-341, 2007.
- MUNDAY, C.J.; WHITEHEAD, G.M.; TODD, N.J.; CAMPBELL, M.; HAWKEY, P.M. Predominance and genetic diversity of community - and hospital - acquired CTX-M extended-spectrum β -lactamases in York, UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 54, p. 628-633, 2004.
- MUNDAY, C.J.; XIONG, J.; LI, C. *et al.* Dissemination of CTX-M type β -lactamase in Enterobacteriaceae isolates in the people's Republic of China. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 23, p. 175-180, 2003.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 7.ed. Approved Standard, M7-A7 NCCLS, Wayne, PA, 2006.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. M100-S17 NCCLS, Vol. 27 N° 1, 2007.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS.. Perfomance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; 6th ed. M2A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.1997.
- PAGANI LAURA; EMANUELA DELL AMICO; ROBERTA MIGLIAVCCA; MARCO MARIA D' ANDREA; ERNESTO GIACOBONE; GIANFRANCO AMICOSANTE; EGIDIO ROMERO AND GIAN MARIA ROSSOLINI. Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in Northern Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.4264-4269, 2003.
- PAI, H.; LYU, S.; HYANG LEE, J.; KIM, J.; KWON, Y.; KIM, J.W.; CHOE, K.W. Survey of extend-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1758-1763, 1999.

- PATRÍCIA A BRADFORD. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, Epidemiology, and Detection of this Important Resistance Threat. **Clinical Microbiology Reviews**. v.14, p. 933-951. 2001.
- PELCZAR MJ JR., CHAN ECS, KRIEG NR. Microbiologia conceitos e aplicações. 2^a edição, **Editora Makron Books**, Vol. 2, p. 118, 119, 122, São Paulo, 1996.
- PERILLI M.; GIUSEPPE C.; MARIANNA F.; BERNARDETTA S.; CRISTINA P.; FRANCESCO L.; GIAN M. R.; GIANFRANCO A. Biochemical analysis of TEM-134, a new TEM-type extended-spectrum β -lactamase variant produced in a *Citrobacter koseri* clinical isolate from an Italian hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 60, p. 877-880, 2007.
- PODSCHUM, R.; ULLMANN, U. Incidence of *Klebsiella planticola* among clinical *Klebsiella* isolates. **Medical Microbiology Letters**, v.3, p.90-95, 1994.
- PODSCHUM, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella*. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 11, N. 4, p. 589-603.1998.
- PRABHA LAL; ARTI KAPIL; BIMAL K.; DAS & SEEMA SOOD. Occurrence of TEM & SHV gene in extended spectrum β -lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella* sp. Isolated from a tertiary care hospital. **Indian J Med Res**. v. 125. P. 173-178, 2007.
- QUINTEROS, M.; RADICE, M.; GARDELLA, N.; RODRÍGUEZ, M.M.; COSTA, N.; KORBENFELD, D.; COUTO, E.; GUTKIND, G.; MICROBIOLOGY STUDY GROUP. Extended-Spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 47: 2864-2867, 2003.
- RASHEED J. K.; GREGORY J.A.; HESNA Y.; ANNE MARIE Q.; ANTONIO DOMÉNECH-SÁNCHEZ; JANA M. S.; JAMES W. B.; MARY JANE F.; GEORGE A. JACOBY; FRED C. TENOVER. Characterization of the Extended-Spectrum β -lactamase Reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which Produces the novel enzyme SHV-18. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**. v. 44. P. 2382-2388, 2000.
- RASHEED J. K.; C. JAY; B. METCHOCK; F. BERKOWITZ; L. WEIGEL; J. CRELLIN; C. STEWARD; B. WILL; A.A. MEDEIROS; F.C. TENOVER. Evolution of extended-spectrum β -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**. v. 41. P. 647-653, 1997.
- RIBEIRO FILHO N. Agentes antimicrobianos. In: infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. Editora Atheneu, São Paulo, 2000.
- RICE L. B.; L.L. CARIAS; A.M. HUIJER; M. BONAFEDE; R. HUTTON; C. HOYEN; R.A. BONOMO. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 β -lactamase and an piperacillin-

- tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**. v. 44. p. 362-367, 2000.
- ROBIN F.; JULIEN D.; CÉDRIC S.; OLIVIER T.; OLIVIER L.; CATHERINE C.; RICHARD B. Evolution of TEM-type enzymes: biochemical and genetic characterization of two new complex mutant TEM enzymes, TEM-51 and TEM-52, from a single patient. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.51, N4 p.1304-1309, 2007.
- SALADIN M.; VAN T. B. C.; THIERRY L.; JEAN-LUE D.; JEAN-LOUIS H.; ZAHIA O.; CHARLOTE V.; FRANÇOISE D.; ALAIN P.; GUILLAUME A. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. **FEMS Microbiology Letters**. V.209, p. 161-168, 2002.
- SANDERS, C.C., AND W. E. SANDERS JR. B-lactamase in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. **Clin. Infect. Dis.** 15:824–839, 1992.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.74, p.5463-5467, 1977.
- SHANNON, K.; STAPLETON, P.; XIANG, X.; JOHNSON, A.; BEATTIE, H.; EL BAKRI, F.; COOKSON, B.; FRENCH, G. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing nosocomial outbreaks of infection in the United Kingdom. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.3105-3110, 1998.
- SOGÉ, OLUSEGUN O.; QUEENAN, ANNE MARIE; OJO, KAYODE, K. OJO; BOLANLE, A. ADENIYI, BOLANLE A. AND MARILYN, C. ROBERTS. CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase from Nigerian *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.57, p.24-30, 2006.
- SOUZA LOPES A. C.; FALCÃO RODRIGUES J. DE MORAIS JÚNIOR M.A. NMolecular Typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. **Microbiological Research**. v. 160, N1, p.37-46.
- SPRATT, B. G. Distinct penicillin binding proteins involved I the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.72, p.2999-3003, 1975.
- STÅLE TOFTELAND; BJORG H.; KRISTIN H. D.; GUNNAR S.; S.; MARTIN S.; TIMOTHY R. W.; ARNFINN S. AND NORWEGIAN ESBL STUDY GROUP. Effects of phenotype and genotype o methods for detectionof extended-spectrum- β -lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, p. 199-205.

- STEFANOVA E. M.; TOMBERG J.; OLESKY M.; HÖLTJE J. V.; GUTHEIL W. G.; NICHOLAS R. A. Neisseria gonorrhoeae penicillin-binding protein 3 exhibits exceptionally high carboxypeptidase and β -lactam binding activities. **Biochemistry**. v. 42, p. 14614-14625.
- TAVARES W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Vol. 33, p. 281-301, Mai-Jun, 2001.
- TORTORA G. J., FUNKE BR, CASE C. L. Microbiologia. 6 edição, Editora Artmed, p. 15, 86, 302, 303, 533, 540, Porto Alegre, 2000.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. (Eds.) **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 586 p.
- TZOUVELEKIS, L.S., E. TZELEPI, P.T. TASSIOS, AND N. J. LEGAKIS, 2000. CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. **Int. J. Antimicrobial Agents** 14: 137-142.
- VERAS D. L.; SOUZA LOPES A. C.; MORAIS JÚNIOR M. A. Estudo Molecular e fenotípico de fatores de resistência a antimicrobianos em isolados de *Klebsiella pneumoniae*. 2007. Dados não publicados.
- VILLEGAS, MARIA VIRGINIA; CORREA, ADRIANA; PEREZ, FEDERICO; ZULUAGA, TANIA; RADICE, MARCELA; GUTKIND GABRIEL; CASELLAS, JOSÉ MARIA; AYALA, JUAN; LOLANS, KAREN; QUINN, JOHN P AND THE COLOBIAN NOSOCOMIAL RESISTANCE STUDY GROUP. CTX-M-12 β -lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate in Colombia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v.48, p. 629-631, 2004.
- WATSON J. D.; BAKER T. A.; STEPHEN P. B.; GANN ALEXANDER; LEVINE MICHAEL LOSICK. Biologia Molecular do gene. 5ª edição, Editora Artmed, 2006.
- WILLIAMS, PAUL. Sub-MICs of cefuroxime and ciprofloxacin influence interaction of complement and immunoglobulins with *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.31, p. 758-762, 1987.
- WU T.L.; L.K. SIU; L.H. SU; T.L. LAUDERDALE, F.M. LIN; H. S. LEU; T.Y. LIN; AND M. HO. Outer membrane protein change combined with co-existing TEM-1 and SHV-1 β -lactamases lead to false identification of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal antimicrobial and chemotherapy**, v.47, p. 755-761, 2001.