

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



ROSIMARY DE JESUS GOMES TURRI

ESTUDO DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS DE *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*  $\beta$  - LACTAMASES ESPECTRO ESTENDIDAS

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Rosimary de Jesus Gomes Turri e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular na Área de Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Tomomasa Yano

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Emílio Levy

CAMPINAS - SP

2003

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	Unicamp
	T 867e
V	EX
TOMBO BCI	55628
PROC.	16-124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/09/03
Nº CPD	

CM00188933-6

Bib-id 300081

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

T867e

**Turri, Rosimary de Jesus Gomes**

Estudo de fatores de virulência em amostras de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*  $\beta$  - lactamases espectro estendidas /  
Rosimary de Jesus Gomes Turri.--  
Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Tomomasa Yano  
Co-orientador: Carlos Emílio Levy  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .  
Instituto de Biologia.

1. Virulência. 2. Hemolise e hemolisinas. 3. Infecções. I. Yano, Tomomasa. II. Levy, Carlos Emílio. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

**DATA DA DEFESA: 08/07/03**

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. Tomomasa Yano



---

Profa. Dra. Clarice Weis Arns



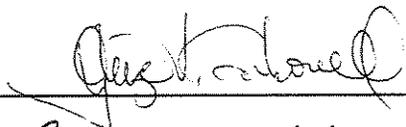
---

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite



---

Profa. Dra. Gleize Villela Carbonell



---

Prof. Dr. Sérgio Marangoni



---

Profa. Dra. Maria Magali Stelato Rocha Soares

---

Profa. Dra. Cleide Ferreira Catani

---

Trabalho executado no Laboratório de Antígenos Bacterianos I, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas e no Laboratório de Microbiologia Clínica do Centro Infantil Boldrini.

2486778004

Dedico aos meus filhos Emanuele, Giovanni e Paola, que dão sentido à minha vida e cuja existência me fortalece, ao meu marido Rodiney minha eterna gratidão pela paciência, companheirismo e carinho despendidos durante toda a realização deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor Tomomasa Yano, orientador dessa tese, minha gratidão e amizade pela orientação e disponibilidade dos recursos físicos e financeiros do seu Laboratório, para a concretização desse trabalho.

Ao Professor Doutor Carlos Emílio Levy, pela co-orientação dessa tese, pelo fornecimento das amostras estudadas e pela disponibilidade do Laboratório de Microbiologia Clínica do Centro Infantil Boldrini, onde foram realizados os testes para isolamento e identificação das amostras e a classificação em ESBL (+).

À Carmen, do Laboratório de Microbiologia Clínica do Centro Infantil Boldrini, pelo apoio técnico no desenvolvimento dos testes realizados neste trabalho, pela amizade e companheirismo.

Ao Professor Doutor Carlos Francisco Sampaio Bonafé, então Coordenador do Curso de Bioquímica, à Profa. Dra. Eneida de Paula, Coordenadora do Curso de Biologia Funcional e Molecular, aos membros da Comissão de Pós-Graduação pela aceitação e acolhida neste curso, e as secretárias Andréia e Marina pelo apoio concedido.

Aos Membros na Banca Prévia: Profa. Dra. Clarice Weis Arns, Prof. Dr. José Camilo Novello e em especial ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite pelas sugestões e ajuda na correção final deste trabalho.

À grande amiga Gonçala Maria Martins Arita, pelo seu carinho e ajuda na confecção deste trabalho.

À Rosângela do Laboratório de Microbiologia Clínica do Centro Infantil Boldrini, pelo isolamento e identificação das amostras utilizadas neste estudo.

À Patrícia Figueirêdo, que se tomou uma grande amiga, pelo auxílio e apoio em diversos experimentos.

À amiga Stella por suas palavras de incentivo e constante disponibilidade para o preparo de materiais e desenvolvimento de experimentos.

Às amigas do Laboratório de Microbiologia da Unicamp, Gleize, Rosabel, Eneida, Márcia Tomy, Márcia Regina, Silvia Simi e Cleide pelas valiosas contribuições no desenvolvimento dos experimentos, pelos momentos agradáveis e pelo companheirismo.

Às Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti do Laboratório de Virologia IB/Unicamp, pela amizade, disponibilidade de seu Laboratório e pelo fornecimento das culturas de células utilizadas neste experimento.

À amiga Ana Lúcia do Laboratório de Virologia IB/Unicamp, pela amizade e desprendimento no fornecimento das culturas de células.

Às amigas Sandra, Verena e Daniele do Laboratório de Virologia IB/Unicamp pela amizade, apoio e palavras de incentivo.

À amiga Mirtes pelo apoio técnico em diversos experimentos nesta tese.

Ao Erivaldo pela ajuda e disponibilidade constantes.

Aos amigos Evandro, Luciano, Carol Yeko, Luciana, Mario Paulo, Gérson e Cláudio pelo apoio e agradável convivência.

À amiga Maria Raquel pelas palavras de estímulo, sugestões e companheirismo.

Às amigas Mariângela e Magali pelas palavras de incentivo e apoio.

Às bibliotecárias do Instituto de Biologia da Unicamp pela atenção e auxílio.

A todos os colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia IB/Unicamp pela agradável convivência durante esses anos.

À Direção das Faculdades Integradas da Fundação de Ensino Otavio Bastos (FIFEOB), pela colaboração e apoio dispensados, fundamentais para a realização do doutoramento.

À Pontifícia Universidade Católica de Campinas agradeço o apoio e o incentivo para a capacitação.

A todas as pessoas e Instituições que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ninguém ignora tudo.  
Ninguém sabe tudo.  
Todos nós sabemos alguma coisa.  
Todos nós ignoramos alguma coisa.

Paulo Freire

## SUMÁRIO

	página
Lista de Quadros e Tabelas .....	xii
Lista de Figuras .....	xiv
Lista de Abreviaturas .....	xv
Resumo .....	xvii
Abstract .....	xviii
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. OBJETIVOS .....	04
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	05
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
4.1. Amostras .....	26
4.2. Caracterização Bioquímica das amostras.....	27
4.3. Determinação do Padrão de Resistência às Drogas Antimicrobianas e do padrão ESBL(+) e ESBL(-).....	27
4.3.1. Teste de Double Disc Synergy (DDS) .....	27
4.3.2. Drogas Antimicrobianas .....	28
4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Antibiótico $\beta$ -lactâmico sobre amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Escherichia coli</i> ESBL(+) pelo método de diluições .....	31
4.5. Detecção de citotoxinas .....	31
4.5.1. Produção de Hemolisinas .....	31
4.5.1.1. Produção de hemolisina em placas de ágar-sangue em diferentes condições de aeração .....	31
4.5.1.2. Produção de hemolisina extra e intracelular em diferentes condições de aeração .....	32
4.5.1.2.1. Condições de cultivo .....	32
4.5.1.2.2. Realização do teste .....	33
4.5.2. Expressão de hemolisina .....	34
4.5.2.1. Influência de íons, quelante de ferro e da aeração sobre a expressão de hemolisina ligada à célula .....	34
4.5.2.2. Influência de íons e de quelante de ferro sobre a expressão de hemolisina extracelular em diferentes condições de aeração.....	34

4.5.2.2.1. Condições de cultivo .....	34
4.5.2.2.2. Realização do teste .....	35
4.5.3. Detecção de citotoxinas em culturas de células .....	35
4.5.3.1. Cultivo das amostras .....	35
4.5.3.2. Obtenção de extratos com mitomicina C .....	36
4.5.3.3. Obtenção de extratos com polimixina B .....	36
4.5.3.4. Preparo das culturas de células .....	37
4.5.3.5. Ensaio de citotoxicidade .....	38
4.6. Teste de resistência ao soro humano normal.....	38
4.7. Produção de aerobactina.....	39
4.7.1. Cultivo das amostras bacterianas .....	39
4.7.2. Realização do teste .....	40
4.8. Teste de adesão em linhagens de células .....	40
4.8.1. Cultivo das amostras .....	40
4.8.2. Preparo da cultura de células .....	40
4.8.3. Realização do teste .....	41
4.9. Sepsis experimental em camundongos .....	42
4.10. Detecção da produção de enterotoxinas termo – estável (Sta).....	43
4.11. Estudo histológico dos órgãos de camundongos infectados pelas amostras de <i>K.pneumoniae</i> e <i>E.coli</i> ESBL (+) e ESBL (-) .....	43
4.11.1. Cultivo das amostras .....	43
4.11.2. Coleta de material .....	44
4.11.3. Processamento e coloração .....	44
5. RESULTADOS .....	45
5.1. Perfil Bioquímico das Amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Escherichia coli</i> ESBL (+) e ESBL (-) isoladas de hemocultura .....	45
5.2. Determinação do Padrão de ESBL (+) e ESBL (-) das amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Escherichia coli</i> isoladas de hemocultura. ....	46
5.3. Determinação da concentração inibitória mínima de ceftriaxona para amostras de <i>K. pneumoniae</i> e <i>E.coli</i> $\beta$ - Lactamases espectro estendidas .....	46
5.4. Produção de Citotoxinas .....	48

5.4.1. Hemolisinas .....	48
5.4.1.1. Detecção em placas de ágar-sangue em diferentes condições de aeração .....	48
5.4.1.2. Detecção de Hemolisina Extra e Intracelular em Sobrenadantes das Culturas e dos Sonicados das amostras ESBL(+) e ESBL (-) ..	50
5.4.1.3. Expressão de Hemolisina pelas Amostras ESBL (+) e ESBL (-).....	52
5.4.1.3.1. Influência de íons, quelante de ferro e da aeração na expressão de hemolisinas em placas de ágar-sangue .....	52
5.4.1.3.2. Influência de íons e de quelante de ferro sobre a expressão de hemolisina extracelular em aerobiose.....	54
5.4.2. Detecção de Citotoxinas em Culturas de Células .....	55
5.4.2.1. Detecção de Citotoxinas em Sobrenadantes das Amostras .....	55
5.4.2.2. Extração com Mitomicina C .....	55
5.4.2.3. Extração com Polimixina B .....	56
5.4.2.4. Influência da Dose Subinibitória de Ceftriaxona sobre a produção de Citotoxinas em culturas de Células Vero, HeLa e HT-29.....	56
5.5. Resistência à Atividade Bactericida do Soro Humano Normal pelas Amostras de <i>K.pneumoniae</i> e <i>E.coli</i> ESBL (+) e ESBL (-) .....	57
5.6. Produção de Aerobactina .....	57
5.7. Adesão em Células HeLa e HT-29 .....	59
5.8. Teste de Patogenicidade .....	62
5.9. Detecção de Enterotoxina Termo-Estável .....	62
5.10. Estudo Histológico dos Órgãos de Animais submetidos à infecção por amostras de <i>K.pneumoniae</i> e <i>E.coli</i> ESBL (+) e ESBL(-) .....	63
6. DISCUSSÃO .....	67
7. CONCLUSÕES .....	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Amostras Beta Lactamases Espectro Estendidas - ESBL (+) e ESBL (-) isoladas de hemoculturas de pacientes imunossuprimidos utilizadas no presente estudo .....	26
Quadro 2. Drogas antimicrobianas utilizadas na execução do teste de Antibiograma e determinação do padrão ESBL (+) .....	30
Tabela 1. Perfil bioquímico das amostras .....	45
Tabela 2. Perfil de sensibilidade e resistência às drogas antimicrobianas das amostras de <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i> ESBL (+) .....	47
Tabela 3. Perfil de sensibilidade e resistência às drogas antimicrobianas das amostras de <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i> ESBL (-).....	48
Tabela 4. Correlação da produção de hemolisina pelas amostras ESBL (+) e ESBL (-) em placas de ágar-sangue em aerobiose e anaerobiose sob o efeito ou não da dose subinibitória de Ceftriaxona .....	51
Tabela 5. Influência de íons e quelante de ferro na produção de hemolisina em placas de ágar-sangue em anaerobiose .....	53
Tabela 6. Influência de íons e do quelante de ferro na produção de hemolisina em placas de ágar-sangue em aerobiose .....	53
Tabela 7. Influência de íons e quelante de ferro na expressão da hemolisina extracelular em sobrenadantes das culturas das amostras ESBL (+) e ESBL (-) .....	54
Tabela 8. Expressão da hemolisina extracelular em sobrenadantes de culturas das amostras ESBL (+) e ESBL (-) .....	55
Tabela 9. Padrão de adesão das amostras de <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i> ESBL (+) e ESBL (-) em células HeLa .....	59

Tabela 10. Teste de patogenicidade em camundongos inoculados com as amostras ESBL (+) e ESBL (-) .....	62
---	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Determinação do padrão ESBL (+) e ESBL (-) através do teste Doublé-disk synergism (DDS).....	29
Figura 2. Efeito bactericida de 50% do soro humano normal sobre amostras representativas de <i>K. pneumoniae</i> ESBL (+) e ESBL (-) e <i>E. coli</i> K12 .....	58
Figura 3. Efeito bactericida de 50% do soro humano normal sobre amostras representativas de <i>E. coli</i> ESBL (+) e ESBL (-) e K12 ....	58
Figura 4. Células HeLa controle (aumento de 1.000x) .....	60
Figura 5. Adesão difusa-like em células HeLa – <i>E. coli</i> ESBL (+) (aumento de 1.000 x) .....	60
Figura 6. Adesão agregativa em células HeLa – <i>E. coli</i> ESBL (+) (aumento de 1.000 x) .....	61
Figura 7. Adesão localizada-like em células HeLa – <i>E. coli</i> ESBL (+) (aumento de 1.000 x) .....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATV – Associação Tripsina Versene

AMC – Ácido Clavulâmico + Amoxicilina

AMI – Amicacina

AMP – Ampicilina

ATM – Aztreonam

BHI – Infusão de cérebro e coração

BSA – Albumina de soro bovino

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio

CaCo-2 – Célula de carcinoma de cólon humano

CAZ – Ceftazidima

CFL – Cefalotina

CFO – Cefoxitina

CIB – Centro Infantil Boldrini

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIP – Ciprofloxacina

CLO – Cloranfenicol

CPM – Cefepime

CRO – Ceftriaxona

CTX – Cefotaxima

DTT – Ditioneitol

EDDA – Etilenodiamina-di (o-hidroxifenol) ácido acético

ESBL – Beta-lactamases espectro estendido

FeCl<sub>3</sub> – Cloreto de ferro

K ou KOXY – Beta-lactamase produzida por *Klebsiella oxytoca*

IPM – Imipenem

HeLa – Células de carcinoma de útero humano

HT-29 – Célula de adenocarcinoma de colo humano

LB – Meio Luria Bertani

LVZ – Levofloxacina

MDBK – Células de rim de boi Madine-Derby

MEM – Meio mínimo essencial de Eagle

MH/K-HA – Hemaglutinação manose resistente tipo *Klebsiella pneumoniae*

MRHA – Hemaglutinação manose resistente

MSHA – Hemaglutinação manose sensível

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

OXA – Oxacilina

PBS – Tampão salina fosfato

SBA – Ampicilina + Sulbactam

SHV – Sulfidril Variável

SUT – Sulfozotrim

TEM – Temoniera

TSB – Caldo tríptico de soja

TSI – Tríplice açúcar ferro

TZP – Piperaciclina + Tazobactam

## RESUMO

A patogênese da *K.pneumoniae* e *E.coli* pode ser diretamente influenciada pelos fatores de virulência, dentre os quais encontram-se polissacarídeos capsulares, lipopolissacarídeos tóxicos, adesinas e sistema de aquisição de ferro. Além desses fatores de virulência, muito pouco é conhecido sobre outros fatores que podem participar da patogênese da *K.pneumoniae*. O presente trabalho estuda os fatores de virulência de *K.pneumoniae* e *E.coli* isoladas de infecções nosocomiais em amostras ESBL (+) e ESBL (-), tendo como objetivos a comparação do grau de patogenicidade e produção de fatores de virulência por essas amostras *in vivo* e *in vitro*; a verificação da influência das condições de cultivo sobre a expressão de citotoxinas; o estudo do padrão de adesão em linhagens celulares; análise da influência da dose subinibitória de antibióticos beta-lactâmicos sobre a produção de fatores de virulência pelas amostras ESBL (+). *K.pneumoniae* e *E.coli* ESBL (+) apresentaram atividades hemolíticas moduladas pelo meio de cultura e pelas condições de cultivo, frente a sangue de equino e carneiro. A dose subinibitória do antibiótico estimulou a produção da hemolisina, sobre hemácias de eqüinos em meio Müller-Hinton apenas na presença do oxigênio. A carência de ferro nos meios induziu a produção de hemolisina, independente da aeração para hemácias eqüinas pelas amostras ESBL (+). O sobrenadante das culturas bacterianas apresentou atividade citotóxica em culturas de células HeLa, Vero e HT-29. Amostras ESBL (+) foram mais resistentes à ação bactericida do soro humano normal que as ESBL (-). O padrão de adesão predominante entre as amostras foi do tipo agregativo. Não foi observada diferença no grau de virulência para camundongos entre as amostras ESBL (+) e ESBL (-).

## **STUDY OF VIRULENCE FACTORS IN STRAINS OF *Klebsiella pneumoniae* AND *Escherichia coli* $\beta$ -LACTAMASES EXTENDED SPECTRUM**

### **ABSTRACT**

Virulence factors, such endotoxin, adhesins, cell envelope and the acquisition of iron system may be associated with *K. pneumoniae* and *E. coli* pathogenicity. However others virulence factors are not yet studied for understanding pathogenesis of *K. pneumoniae*. The aim of the present study is the comparison of potential virulence factors in strains of *K. pneumoniae* and *E. coli* ESBL (+) and ESBL (-) isolated from nosocomial infections, such characterization of adhesive properties in eukaryotic cells , influence of sub inhibitory dose of beta-lactams antibiotics in toxins expression and virulence factors production in ESBL (+) strains. *K. pneumoniae* and *E. coli* ESBL (+) showed hemolytic activity towards sheep and horse erythrocytes regulated by culture conditions. The sub inhibitory dose of beta lactams antibiotics increased the hemolysin production in Mueller–Hinton agar with horse erythrocytes in oxygen presence. The iron absence in media culture improved the hemolytic activity expression, with horse erythrocytes in ESBL (+) strains independent of oxygen. The bacterial supernatant culture showed cytotoxic activity in HeLa, Vero and HT-29 cell lines. The ESBL (+) strains were more resistant to the bactericidal action of normal human serum than the ESBL (-). The aggregative pattern of adherence was the predominant among *E. coli* and *K. pneumoniae* and was not observed virulence differences in mice in ESBL (+) and ESBL (-) strains.

## 1. INTRODUÇÃO

A família *Enterobacteriaceae* representa a maior e mais heterogênea coleção de bacilos Gram-negativos de importância médica. Apesar da complexidade desta família, mais de 95% dos microrganismos isolados clinicamente importantes pertencem à apenas dez gêneros e incluem menos de 25 espécies (MURRAY, *et al.*, 2000). A incidência de infecções nosocomiais causadas por bacilos Gram-negativos tem aumentado marcadamente nas três últimas décadas (DI MARTINO *et al.*, 1996).

Enterobactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia* são importantes patógenos oportunistas, comumente isolados em casos de infecções do trato urinário, respiratório e de quadros de sepse (LIVRELLI *et al.*, 1996). *Klebsiella pneumoniae* está envolvida em várias infecções que ocorrem após colonização bacteriana do trato gastrointestinal de pacientes (DI MARTINO *et al.*, 1996), e acomete indivíduos imunossuprimidos que são hospitalizados e sofrem de doenças como diabetes mellitus e obstrução pulmonar crônica (PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

Foram identificados numerosos fatores de virulência nos membros da família *Enterobacteriaceae*. Alguns são comuns a todos os gêneros, enquanto outros são exclusivos de cepas virulentas específicas (MURRAY, *et al.*, 2000). Dentre os fatores de virulência identificados em *Klebsiella pneumoniae* estão: polissacarídeos capsulares que conferem resistência à fagocitose e à ação bactericida do soro, lipopolissacarídeos tóxicos, adesinas e sistemas de aquisição de ferro que facilitam seu crescimento nos tecidos durante a disseminação sistêmica (DARFEUILLE-MICHAUD *et al.*, 1992; PODSCHUN & ULLMANN, 1998). Além destes fatores de virulência, muito pouco é

conhecido sobre outros fatores que podem participar da patogênese da *K. pneumoniae* (LAI *et al.*, 2000).

Tem sido relatado que a maioria das linhagens de *K. pneumoniae* isoladas de infecções nosocomiais são altamente resistentes a um número cada vez maior de antibióticos, especialmente as linhagens produtoras de  $\beta$ -lactamases espectro estendido (LIVRELLI *et al.*, 1996; LAI *et al.*, 2000). O termo  $\beta$ -lactamase espectro estendido (ESBLs), se refere a enzimas  $\beta$ -lactamases codificadas por genes plasmidiais que diferem da enzima parental pela substituição de alguns aminoácidos que alteram o sítio ativo (PATTERSON *et al.*, 1997). As  $\beta$ -lactamases espectro estendido inicialmente emergiram em bacilos Gram-negativos na Europa na década de oitenta e rapidamente se disseminaram para outros continentes. Este tipo de resistência tem sido detectado com maior frequência em *K. pneumoniae*, mas ocorre e é transferível para outros gêneros, incluindo *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, entre outros (PATTERSON *et al.*, 1997). Como consequência numerosas novas ESBLs têm sido descritas (JACOBY & BUSH, 2000; *apud* ZEMELMAN, 2001)

Segundo LIVRELLI *et al.* (1996), até o início dos anos setenta as linhagens de *K. pneumoniae* isoladas de casos clínicos, produziam somente a penicilinase SHV, codificada por genes cromossomais, quando então foram isoladas amostras que possuíam um plasmídeo codificando a enzima TEM-1.

No início dos anos oitenta, os problemas mais comuns associados com as  $\beta$ -lactamases de bactérias Gram-negativas eram causados por  $\beta$ -lactamases mediadas por plasmídios, como as TEM-1, TEM-2 e SHV-1. Estas enzimas são  $\beta$ -lactamases de amplo espectro, que falham na atividade contra drogas estáveis como cefamicinas, oximinocefalosporinas, monobactâmicos, ou carbapenemas, e são produzidas por

*Escherichia coli*, *K. pneumoniae* e outras enterobactérias, sendo menos freqüentes em outras famílias de bactérias (THOMSON & MOLAND, 2000). Algumas das novas  $\beta$ -lactamases são codificadas por genes cromossomais e plasmidiais que se permutam, permitindo maior capacidade de disseminação, levando a potenciais problemas epidemiológicos (THOMSON & MOLAND, 2000).

LIVRELLI *et al.* (1996), observaram que genes responsáveis pela síntese da adesina não fimbrial CF29K, relacionada ao padrão de adesão difusa de amostras de *K.pneumoniae* isoladas de casos clínicos, estão localizados em um plasmídio conjugativo junto com genes que codificam outros fatores de virulência, tais como aerobactina e a síntese das  $\beta$ -lactamases espectro estendido CAZ-1 e TEM-5.

Embora não conclusivos, nos últimos anos vários estudos têm sido feitos relacionando o uso de antibióticos com a expressão de Shiga - toxinas por amostras de *E.coli* O157 (YOH *et al.*, 1997; GRIF *et al.*, 1998; KIMMITT *et al.*, 1999; KIMMITT *et al.*, 2000).

Considerando que infecções provocadas por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* representam de 5 a 7,5 % de todas as infecções nosocomiais e que a maioria dos surtos é provocada por amostras que expressam  $\beta$ -lactamases de amplo espectro, o presente estudo tem os seguintes objetivos:

## 2. OBJETIVOS

2.1. Avaliar e comparar a patogenicidade e produção de fatores de virulência como: hemolisinas, citotoxinas, aerobactina, resistência sérica e padrão de adesão em linhagens celulares, das amostras ESBL (+) e ESBL (-) isoladas de infecções nosocomiais;

2.2. Analisar a influencia da dose subinibitória de antibiótico  $\beta$ -lactâmico e das diferentes condições de cultivo na produção e expressão dos fatores de virulência pelas amostras em estudo

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Enterobactérias produtoras de  $\beta$ - lactamases espectro estendidas (ESBLs) têm se tomado um dos maiores problemas nas últimas décadas especialmente em infecções nosocomiais (SIU *et al.*, 1999) com surtos sendo reportados no mundo todo (WIENER *et al.*, 1999). Vários trabalhos têm documentado o risco de mortalidade devido a falhas na identificação de bactérias produtoras de ESBLs (KARAS *et al.*, 1996). Todo bacilo Gram negativo produz algum tipo de  $\beta$ -lactamase de maneira constitutiva. Porém, muitas vezes em concentrações muito baixas que não são capazes de degradar o anel  $\beta$  -lactâmico a ponto de expressar o caráter fenotípico de resistência. Beta-lactamases do tipo TEM-1, TEM-2 e SHV-1 são o principal mecanismo de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em microrganismos entéricos Gram-negativos, degradando ureidopenicilinas, piperazina-penicilina (azlocilin, mezlocilin e piperacilina) e cefalosporinas de primeira geração. Mesmo quando sensível *in vitro*, a eficácia clínica destes agentes permanece duvidosa frente às  $\beta$ - lactamases TEM e SHV (MEDEIROS, 1993; *apud* CAVASSIN,2002; LIVERMORE, 1998).

A primeira  $\beta$ -lactamase plasmidial codificada em microrganismos Gram-negativos, a TEM-1, foi isolada em Atenas no ano de 1963. O termo TEM deriva de "Temoniera", nome da paciente de cujo material clínico, uma hemocultura, foi isolada a primeira *Escherichia coli* produtora desta enzima. Em pouco tempo mostrou-se disseminada entre diferentes espécies, originando em 1969, a primeira derivada TEM-2 a partir da mudança de um único aminoácido que alterou o ponto isoelétrico da proteína de 5,4 para 5,6, mas não suas propriedades cinéticas. Atualmente mais de

90% das *E.coli* são resistentes a ampicilina, resultado da difundida produção de TEM-1 (HERITAGE, 1999; BRADFORD, 2001; STEWART, 2001, *apud* CAVASSIN, 2002).

A SHV-1 foi inicialmente denominada PIT-2 em homenagem a Pitton, que a descreveu pela primeira vez em 1972 (HERITAGE, 1999, *apud* CAVASSIN, 2002), passando a SHV devido a uma característica química: "sulfidril variável". Codificada por plasmídios em outras enterobactérias é de codificação cromossômica em *K. pneumoniae*, com frequência de 80% a 90% (LIVERMORE, 1995, *apud* CAVASSIN, 2002; LIVERMORE, 1998). A SHV-1 possui 68 % de aminoácidos idênticos aos da TEM-1 e um ponto isoelétrico de 7,6 (JACOBY, 2000).

O grupo OXA compreende uma série menos comum de  $\beta$ - lactamases codificadas por plasmídios, que são caracterizadas por sua capacidade de hidrolisar oxacilina, floxacilina e meticilina, porém não apresentam atividade sobre os substratos oximino. TEM-1, TEM-2, SHV-1 e em menor grau as OXA, são rapidamente inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactama e tazobactama (JACOBY, 2000).

Essas enzimas atuam por ligação covalente com o sítio carbonila do anel beta-lactâmico, hidrolisando sua ligação amida. Quando produzidas em pequenas quantidades, contribuem fracamente com níveis de resistência aos antibióticos agindo, de maneira ainda não determinada, em ações fisiológicas do metabolismo da parede bacteriana. Algumas das novas  $\beta$ -lactamases são produzidas por genes intercalados no cromossomo e plasmídios, o que permite grande disseminação e confere potencial para epidemias (THOMSON & MOLAND, 2000).

Quatro grupos de novas  $\beta$ -lactamases têm se tornado importantes:  $\beta$ -lactamases espectro estendido,  $\beta$ -lactamases com reduzida sensibilidade a inibidores de

$\beta$ -lactamases,  $\beta$ -lactamases AmpC mediadas por plasmídeos e  $\beta$ -lactamases que hidrolisam carbapênicos (THOMSON & MOLAND, 2000).

Existem vários esquemas de classificação das  $\beta$ -lactamases, sendo dois mais utilizados: a classificação molecular ou esquema Ambler, que é utilizada pelos pesquisadores, mas de limitado significado clínico ou funcional e, a classificação funcional, proposta por Bush em 1989, modificada em 1995 (AMBLER, 1980; BUSH, 1989; BUSH *et al.*, 1995).

A classificação de Ambler identifica grupos de  $\beta$ -lactamases de amplo espectro ao nível molecular, sendo de valor clínico restrito, uma vez que a relação entre seqüência de aminoácidos e o substrato ou perfil de inibidor é pequena e pode ser alterada pela troca de um único aminoácido (THOMSON & MOLAND, 2000).

Quimicamente, as  $\beta$ -lactamases possuem uma serina ou um átomo de zinco no sítio ativo, cada um sendo essencial para hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico. Na classificação de Ambler as serinas  $\beta$ -lactamases são subdivididas em três classes: A (penicilinasas), C (cefalosporinasas) e D (oxacilinasas). As classes A e C são as mais freqüentemente encontradas clinicamente. As  $\beta$ -lactamases da classe A incluem as que são codificadas por genes cromossomais de *Klebsiella spp.*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter koseri*, e muitas *Bacteroides spp.*, bem como penicilinasas mediadas por plasmídios,  $\beta$ -lactamases de amplo espectro ou ESBLs (THOMSON & MOLAND, 2000). As  $\beta$ -lactamases da classe C (AmpC) são produzidas por genes cromossomais em muitos bacilos Gram-negativos, são induzíveis, primariamente hidrolisam cefalosporinas e resistem aos inibidores de  $\beta$ -lactamases. As  $\beta$ -lactamases da classe D incluem as OXA  $\beta$ -lactamases que são tipicamente penicilinasas mediadas por plasmídios que são capazes de eficientemente hidrolisar oxacilina e geralmente não

são bem inibidas pelo ácido clavulônico como são as  $\beta$ -lactamases da classe A. As enzimas da classe D são as que contém zinco ou metalo  $\beta$ -lactamases (THOMSON & MOLAND, 2000).

A classificação de BUSH está baseada no perfil dos substratos e nas características dos inibidores, compreende quatro grupos contendo subgrupos designados de forma que incluam tipos de  $\beta$ -lactamases reconhecidos. Os principais grupos são: cefalosporinases (classe C de Ambler), penicilinases e  $\beta$ -lactamases de amplo espectro que são inibidas pelo ácido clavulônico (classe A e D de Ambler), metalo  $\beta$ -lactamases e  $\beta$ -lactamases não classificadas (THOMSON & MOLAND, 2000).

Existem atualmente mais que setenta enzimas derivadas da família TEM-1 e TEM-2, mais de vinte derivadas da família SHV-1 e cerca de seis na família OXA. Cada uma apresenta uma ou mais substituições de aminoácidos, que altera a configuração e a capacidade de ligação do sítio ativo do  $\beta$ -lactâmico, aumentando o espectro dos substratos (JACOBY, 2000; THONSON & MOLAN, 2000). Como consequência, essas substituições podem mudar o ponto isoelétrico da enzima. A maioria é mais atuante contra o aztreonam e a ceftadizima do que contra a cefotaxima, porém para algumas o oposto é verdadeiro. Todas permanecem suscetíveis aos inibidores de  $\beta$ -lactamases e freqüentemente as ESBLs são mais suscetíveis que a enzima mãe. Todas têm perda de especificidade como consequência do espectro ampliado (JACOBY, 1994; JACOBY, 2000).

O uso intensivo de cefalosporinas de espectro ampliado no final da década de 70 e durante a década seguinte, promoveu o surgimento das beta-lactamases de espectro estendido. As enzimas TEM-1 e SHV-1 amplamente disseminadas entre *E.coli* e

*K.pneumoniae*, que conferiam resistência a ampicilina, piperacilina e cefalosporinas de baixo espectro, como cefazolina, sofreram mutações pontuais resultando em alterações importantes no sítio de ligação e/ou capacidade de hidrólise de beta-lactâmicos de espectro estendido, até então resistentes à inativação enzimática (KNOTE, 1983; HERITAGE, 1999, *apud* CAVASSIN, 2002; RICE *et al*, 2000).

Descritas pela primeira vez na década de 80, as ESBLs mantiveram sua ação sobre aminopenicilinas, ureidopenicilinas e cefalosporinas de baixo espectro, estendendo para todas as cefalosporinas de espectro ampliado e monobactâmicos, permanecendo sensíveis apenas a cefamicinas, carbapenêmicos e ao bloqueio com inibidores de beta-lactamases (MEDEIROS, 1993; EISEIN, 1995; EMERY, 1997; THOMSON, 1999; RICE, 2001, *apud* CAVASSIN,2002).

Esse mecanismo significou um grande impacto na prática clínica resultando em problemas como o elevado perfil de resistência, a múltipla resistência associada, a dificuldade de detecção, a participação em surtos, o aumento nas taxas de morbidade e mortalidade, as limitadas opções terapêuticas e as dificuldades na sua prevenção. Outro fato relevante é a sua facilidade de disseminação, mecanismo codificado em grandes plasmídios conjugativos que passam facilmente entre diferentes espécies e mesmo entre diferentes gêneros (RICE, 2000).

A primeira cepa produtora de ESBL foi detectada na Inglaterra e na Argentina em 1982. Na Alemanha em 1983, na Tunísia e França em 1984 e nos Estados Unidos em 1986 (SANDERS, 1992, *apud* CAVASSIN, 2002). Porém, o primeiro caso reportado foi o relato alemão feito por KNOTE em 1983 (MEDEIROS, 1997, *apud* CAVASSIN, 2002), tratando da produção da ESBL SHV-2 em isolados de *K. pneumoniae* e *K. ozaenae* e *Serratia marcescens*.

A nova enzima, SHV-2, demonstrou grande semelhança com a já conhecida SHV-1, resultado da troca de apenas um aminoácido, glicina por serina, na posição 238. Alteração responsável pelo significativo aumento do seu espectro de ação, inativando cefalosporinas de primeira à quarta geração, monobactâmicos e penicilinas de espectro ampliadas e sensíveis à ação de inibidores de beta-lactamases. Dentre os beta-lactâmicos, apenas não degradam cefamicinas e carbapenêmicos (HERITAGE, 1999 *apud* CAVASSIN, 2002).

Após as SHV, foram descritas em 1984 derivados de TEM, resultado da alteração de 3 aminoácidos em uma molécula formada por 263 aminoácidos, a TEM-3 (RICE, 2001, *apud* CAVASSIN, 2002). Atualmente as enzimas derivadas de TEM mundialmente disseminadas são as TEM-10, TEM-12 e TEM-26 que compartilham uma substituição serina na posição 162 e diferem entre si em mutação única nas posições 102 e 237, demonstrando mais especificidade para ceftazidima em comparação para cefotaxima, ceftriaxona e cefepime (JONES, 2000, *apud* CAVASSIN, 2002). Segundo RICE (2001), as alterações nas moléculas originais não passam de 2% da estrutura molecular total, com poucos pontos de troca de aminoácidos.

Além de derivados TEM e SHV, enzimas não relacionadas podem ser classificadas como uma nova família de ESBLs. A definição inicial de beta-lactamases ESBL era baseada nos substratos de espectro estendido hidrolisados e atualmente inclui as beta-lactamases inibidas pelo ácido clavulânico. Deste modo, a nova definição inclui como ESBLs enzimas dos grupos 1 à 4 de Bush-Jacoby-Medeiros derivadas de TEM-1, TEM-2 e SHV-1, assim como K-1, CTX-M e algumas OXA beta-lactamases (BRADFORD, 2001), além de PER, VEB, CME, TLA, IMP, SFO, GES, entre outras,

totalizando mais de 150 ESBLs de diferentes classes, em um universo de mais de 340 beta-lactamases descritas (BUSH, 2001).

A cefotaximase CTX-M é uma enzima relacionada à classe A de Ambler, com baixa correlação com as enzimas TEM e SHV, apenas 40% de similaridade. Descrita na Alemanha e no Leste Europeu no início dos anos 90 (MEM-1 ou CTX-1), está hoje disseminada em uma grande variedade de enterobacteriaceas. Estudo filogenético da família CTX-M revelou quatro grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 e Toho. Até 2.000, ainda não haviam sido descritas na Europa Ocidental e América do Norte. A CTX-M-2 tem sido documentada na Argentina, Uruguai e Paraguai principalmente em *K. pneumoniae*, além de *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Shigella spp*, *Enterobacter clocae*, *Morganella morganii* e *Citrobacter freundii* (CASELLAS, 2000, *apud* CAVASSIN, 2002). São 11 enzimas, das quais 8 foram descritas nos últimos 3 anos. Acredita-se que sua característica marcante seja decorrente da presença de serina na posição 237. A grande afinidade por cefotaxima e baixa afinidade por ceftazidima e aztreonam, chega a índices de atividade hidrolisante de 300:1, fato que deve ser lembrado no momento da escolha dos substratos utilizados nos testes de detecção. (CASELLAS, 2000; BONNET, 2001, *apud* CAVASSIN, 2002). Apresentando sensibilidade ao bloqueio por inibidores de beta-lactamases, preferencialmente o tazobactam.

As enzimas OXA constituem uma família em crescimento dentro das ESBLs. Estas beta-lactamases diferem das plasmidiais clássicas TEM e SHV por pertencerem à classe molecular D e grupo funcional 2d de Bush-Jacoby-Medeiros. Conferem resistência a ampicilina e cefalotina e são caracterizadas por sua elevada atividade hidrolítica frente oxacilina e cloxacilina e pela fraca inibição por inibidores de beta-lactamases como o ácido clavulânico, com exceção da OXA-18. São descritas enzimas

OXA com atividades de ESBL, e outras não ESBL como a OXA-20, OXA-22, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, e OXA-30. De maneira geral, são encontradas principalmente em *Pseudomonas aeruginosa*, com o relato de codificação também em *Acinetobacter baumannii*, a OXA-21. Não são conhecidos os motivos, mas muitos dos novos membros da família OXA vêm sendo isolados principalmente em focos na Turquia e França, não sendo descritos com a mesma freqüência em outros locais (BRADFORD, 2001, *apud* CAVASSIN, 2002).

O primeiro grande surto descrito por produtoras de ESBLs ocorreu no sudoeste da França de 1985 a 1987, desde então, as ESBLs têm se tornado cada vez mais prevalentes, principalmente entre isolados de *Klebsiella spp.*, em especial *Klebsiella pneumoniae*, chegando a 40% em ambiente hospitalar. Preferência justificada talvez pelo fato de serem hábeis carreadoras de plasmídios e resistentes à dessecação em superfícies, no ambiente e na pele (LIVERMORE, 1995; JONES, 1998 *apud* CAVASSIN, 2002; LIVERMORE, 1998).

Em vista das falhas terapêuticas decorrentes de problemas com a detecção de amostras ESBL em baixos níveis, o NCCLS determinou novas recomendações para o diagnóstico e a interpretação do mecanismo codificado por ESBLs. Ficou definido um sistema em dois passos: primeiro, todo isolado clínico identificado como *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. coli*, devem ser avaliados segundo técnicas de detecção (*screening*); segundo, as amostras com os resultados *screening* positivos devem passar pelos testes de confirmação (NCCLS, 2002).

O primeiro passo, o *screening*, é definido por novos critérios de interpretação da sensibilidade, com novos valores de CIMs e tamanho dos halos de inibição, válidos para cefalosporinas de terceira geração e monobactam, denominadas drogas-chave:

ceftazidima, cefpodoxina, cefotaxima, ceftriaxona e aztreonam. Os baixos níveis de resistência conferidos por algumas ESBLs frente a diferentes cefalosporinas podem estar na faixa de interpretação sensível quando utilizados *breakpoints* tradicionais para bacilos Gram-negativo. Constitui um procedimento técnico de baixo custo e fácil operacionalização, porém, com limitações quanto a sua acurácia (REIS, 1999, *apud* CAVASSIN, 2002).

O segundo passo, para confirmação utiliza testes quantitativos ou qualitativos para demonstrar o bloqueio da atividade enzimática na presença de inibidores de beta-lactamases contra as drogas-chave. A recuperação da sensibilidade observada nas produtoras de ESBLs resulta da inibição irreversível sofrida pelas enzimas (SANDERS, 1993, *apud* CAVASSIN, 2002).

Os testes são realizados com as drogas-chave isoladamente e em associação com bloqueadores, sendo o ácido clavulânico o inibidor mais indicado. De maneira geral, nas técnicas qualitativas a presença de ESBLs é visualizada pelo aumento de 5 mm ou mais nos tamanhos dos halos após a adição do inibidor, enquanto que, com técnicas quantitativas, a diminuição das CIMs em três ou mais diluições logarítmicas ( $\log_2$ ), confirma a presença de ESBLs (THONSON, 2000).

Seguindo ambas as propostas, diferentes técnicas foram desenvolvidas, cada qual com vantagens e desvantagens, assim com diferentes valores de sensibilidade e especificidade (REIS, 1999 *apud* CAVASSIN, 2002). Entre elas: Etest ESBL; Etest das drogas-chave; diluição, com os sistemas MicroScan (Dade Behring, Sacramento, CA) e Vitek (Biomérieux, Haslewood, Mo.) ou em tubos; adição de clavulanato aos discos das drogas-chave; teste tridimensional e, como padrão ouro, técnicas moleculares para avaliação de plasmídios (BROWN, 2000, *apud* CAVASSIN, 2002). Entretanto,

nenhuma técnica fenotípica apresenta isoladamente sensibilidade e especificidade de 100% (BRADFORD, 2001).

Até o momento, a terapia de maior segurança contra ESBL parece ser o uso de carbapenêmicos. Apresentam consistente efeito bactericida mesmo na presença de elevados inóculos, porém seu uso se dá sob o risco de seleção de microrganismos resistentes (MEDEIROS, 1993; FILE, 1999; RICE, 2001, *apud* CAVASSIN, 2002).

A velocidade e a qualidade de detecção da resistência ESBL é de extrema relevância. O uso prévio de antibióticos, em especial ceftazidima, parece ser fator importante na aquisição de produtores de ESBL. Com a possibilidade de disseminação para outras enterobactérias, é crítica a monitoração deste mecanismo nestas espécies (CAVASSIN, 2002).

A detecção correta e precoce da produção de ESBLs pelo laboratório de microbiologia, a atenção ao uso racional de antimicrobianos e a pronta contenção com uso de barreiras são medidas essenciais para prevenir a disseminação em um ambiente nosocomial (MEDEIROS, 1993, *apud* CAVASSIN, 2002).

*Klebsiella pneumoniae* foi primeiro reconhecida por Friedlander em 1882 como um patógeno pneumônico virulento (HORNICK *et al.*, 1992), e permaneceu como causa de pneumonias severas, com índice de mortalidade excedendo 30% apesar do tratamento apropriado com antibióticos.

Como um patógeno oportunista, *Klebsiella spp.*, ataca principalmente indivíduos imunocomprometidos que são hospitalizados e sofrem de severas doenças como diabetes mellitus e obstrução pulmonar crônica. Infecções nosocomiais são causadas principalmente por *Klebsiella pneumoniae*, a espécie clinicamente mais importante do gênero (PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

É estimado que *Klebsiella spp.* causa 8% de todas as infecções bacterianas nosocomiais nos Estados Unidos e na Europa. Como causa de nosocomial bacteremia provocada por Gram-negativos, *Klebsiella* é a segunda e *E.coli* a primeira (DUGGAN, *et al.*, 1985; PITTET *et al.*, 1993; YINNON, *et al.*, 1996; MURRAY *et al.*, 2002).

*Klebsiella spp.* são ubíquas na natureza, sendo encontradas na água, esgoto, solo, plantas e colonizando a superfície mucosa de mamíferos como homens, cavalos e suínos. Neste aspecto são semelhantes a *Enterobacter* e *Citrobacter*, mas diferentes de *Shigella spp.* e *E.coli*, que são comuns em humanos mas não no ambiente. Em humanos as *K. pneumoniae* estão presentes como saprófitas na nasofaringe e no trato intestinal. A detecção em amostras de fezes varia de 5 a 38%, enquanto na nasofaringe varia de 1 a 6% (ROSE & SCHREISER, 1968; DAVIS & MATSEN, 1974; ROSENTHAL & TAGER, 1975 *apud* PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

Devido às condições não favoráveis ao crescimento de bactérias Gram negativas na pele humana, *Klebsiella spp.* são raramente encontradas neste tecido sendo vistas como membros transitórios da microbiota (KLOOS & MUSSELWHITE, 1975, *apud* PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

Em ambiente hospitalar a porcentagem de colonização está diretamente relacionada com o tempo de permanência no hospital. A porcentagem de isolados em fezes de pacientes hospitalizados é de 77%, na faringe de 19%, e 42% nas mãos dos pacientes (JOHANSON *et al.*, 1969; DAVIS & MATSEN, 1974; COOKE *et al.*, 1979; *apud*, PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

Além dos equipamentos médicos contaminados, devido à falta de procedimentos higiênicos corretos e produtos sangüíneos, o reservatório principal para transmissão de

*Klebsiella spp* no hospital são as mãos dos funcionários e o trato gastrointestinal dos pacientes (MONTGOMERIE, 1979, *apud* PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

O gênero *Escherichia* consiste em cinco espécies, sendo *E.coli* a mais comum e clinicamente importante. Cepas de *E.coli* responsáveis por doenças como gastroenterites e infecções das vias urinárias possuem fatores de virulência especializados. Duas categorias gerais destes fatores são as adesinas e as exotoxinas (MURRAY, *et al.*, 2000). A *E.coli* é capaz de permanecer no trato gastrintestinal ou nas vias urinárias em virtude de sua capacidade de aderir às células que revestem estes tratos, e evitar a sua eliminação em consequência da motilidade intestinal e da ação do fluxo urinário. As cepas de *E.coli* possuem numerosas adesinas altamente especializadas como: pili tipo I e os fatores de colonização (CFA/ I e CFA/ II) em *E.coli* enterotoxigênica ; as fímbrias GVVPQ em *E.coli* enteroagregativa; os pili formadores de feixe (Bbp, bundle – forming pili ) e a intimina em *E.coli* enteroagregativa; e os pili P , adesinas afimbriais ( AFA I e AFA III) e adesinas Dr. em *E.coli* uropatogênica (MURRAY, *et al.*, 2000).

*E. coli* enterotoxigênica produz toxinas termoestáveis (Sta e Stb) e termolábeis (LT-I e LT-II). *E.coli* enterohemorrágica produz toxinas semelhantes à toxina Shiga (SLT - I e SLT – II). Foi constatado que *E.coli* enteroagregativa produz uma toxina termoestável, enquanto as hemolisinas (HLyA) são importantes em *E.coli* uropatogênicas (MURRAY, *et al.*, 2000).

Existe um grande número de *E.coli* no trato gastrintestinal, e, com freqüência, estas bactérias constituem causa de sepse, meningite neonatal, infecções das vias urinárias e gastroenterites. *E. coli* constitui o bacilo Gram-negativo mais comum isolado de pacientes sépticos, e é responsável por mais de 80% de todas as infecções

das vias urinárias adquiridas na comunidade, e pela maioria das infecções hospitalares (MURRAY, *et al.*, 2000).

Especialmente preocupantes são os surtos de infecções hospitalares causadas por linhagens multiresistentes. Desde 1982, linhagens produtoras de ESBL estão envolvidas nestas infecções (REISH *et al.*, 1993). A produção de ESBL freqüentemente é acompanhada por multiresistência a antibióticos tornando as opções de tratamento limitadas. Até o momento linhagens de *K. pneumoniae* e *E. coli* eram suscetíveis aos carbapenêmicos como imipenem e meropenem, entretanto já têm sido isoladas linhagens que apresentaram uma resistência adicional ao imipenem. Estas linhagens possuem plasmídios transmissíveis que codificam beta-lactamases do tipo AmpC (BRADFORD *et al.*, 1997).

As espécies de *Klebsiella* são geralmente identificadas e diferenciadas de acordo com suas reações bioquímicas. O gênero é definido como formado por bacilos Gram-negativos não móveis usualmente encapsulados que produzem lisina descarboxilase, mas não ornitina descarboxilase, que são geralmente positivos no teste de Voges-Proskauer (EDWARDS & ERWIN, 1986, *apud* PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

Uma variedade de métodos tem sido usada com vários graus de sucesso na tipagem de *Klebsiella*: biotipagem, sorotipagem, fagotipagem, tipagem por bactericinas e métodos de tipagem molecular (PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

A sorotipagem é a técnica mais largamente utilizada, sendo baseada nos tipos de antígenos capsulares que são bem desenvolvidos nesse gênero dando às suas colônias aparência mucóide. De 82 antígenos capsulados descritos, 77 formam a base

de um esquema internacionalmente conhecido (ORSKOV & FIFE-ASBURY, 1977; ORSKOV & ORSKOV, 1984, *apud*, PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

Têm sido descritos 08 diferentes antígenos do tipo O em *Klebsiella*, porém de difícil classificação porque sua determinação é dificultada pelos antígenos capsulares que são estáveis ao aquecimento (ORSKOV & FIFE-ASBURY, 1977; ORSKOV & ORSKOV, 1984, *apud*, PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

A tipagem através de antígenos capsulares, mostra boa reprodutibilidade e é capaz de diferenciar muitos isolados clínicos (AYLING-SMITH *et al.*, 1990). O ponto fraco deste método é o grande número de reações cruzadas que ocorre entre os 77 tipos de antígenos, necessitando que os soros individuais sejam absorvidos o que demanda muito tempo para a realização do teste e, a subjetividade das interpretações devido às reações fracas. Como os soros anticápsula de *Klebsiella* não são comercializados, esta técnica é realizada apenas em laboratórios especializados (PODSCHUN & ULLMANN, 1998). Nem a tipagem bioquímica, por bacteriocinas e por fagos sozinhas são suficientemente discriminativas e reproduzíveis para uso em estudos epidemiológicos. A combinação da biotipagem e sorotipagem possibilita a diferenciação de um grande número de biosorotipos (RENNIE & DUNCAN, 1974, *apud* PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

Infecções nosocomiais provocadas por *Klebsiella* envolvem mais comumente o trato urinário e o respiratório, como estes locais diferem consideravelmente nos tipos de mecanismos de defesa apresentados pelo hospedeiro, poderia ser esperado que o padrão de fatores de virulência encontrados em linhagens que produzem infecções urinárias difere daqueles observados em linhagens isoladas de infecções pulmonares (PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

Pesquisas têm identificado cinco principais tipos de fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade de *Klebsiella spp.*, estes são: Antígenos capsulares, Fímbrias (pili), resistência ao soro, lipopolissacarídeos e produção de sideróforos (PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

*Klebsiella spp.*, usualmente desenvolve uma proeminente cápsula composta de polissacarídeos ácidos, consistindo de quatro a seis subunidades de açúcares e freqüentemente de ácido urônico. A cápsula é essencial para a virulência de *Klebsiella spp.*, pois forma um envoltório de estruturas fibrilares que recobrem a superfície da bactéria, protegendo contra a fagocitose e prevenindo a ação bactericida do soro (WILLIAMS *et al.*, 1983; CRYZ *et al.*, 1984; HIGHSMITH & JARVIS, 1985). O mecanismo molecular presumivelmente consiste da inibição da ativação dos componentes do sistema complemento, especialmente o componente C3b (WILLIAMS & TOMAS, 1990). Segundo YOKOSHI *et al.*, (1979) citado por PODSCHUN & ULLMANN (1998), além de sua função antifagocitária, os polissacarídeos capsulares poderiam inibir a diferenciação e a capacidade funcional dos macrófagos *in vitro*. Esta consideração foi abandonada porque têm sido observadas diferenças na virulência entre tipos capsulares diferentes. Linhagens expressando os antígenos capsulares K1 e K2 foram encontradas sendo virulentas para camundongos, enquanto isolados de outros sorotipos mostraram baixa ou nenhuma virulência (MIZUTA *et al.*, 1983). Em lesões experimentais de pele em camundongos, linhagens dos sorotipos K1, K2, K4 e K5 foram mais virulentas que aquelas expressando outros antígenos capsulares (SIMOONS – SMIT *et al.*, 1984).

A virulência conferida a um antígeno K em particular pode estar ligada ao conteúdo de manose dos polissacarídeos. Tipos capsulares com baixa virulência, como

os antígenos K7 ou K12, contêm seqüências repetitivas de manose. Estas seqüências são reconhecidas por lectinas de superfície de macrófagos, que estariam mediando a fagocitose independente da opsonização, conhecida como lectino-fagocitose (ATHAMA *et al.*; 1988; OFEK *et al.*, 1993). Lectino-fagocitose pode ser mediada por lectinas da superfície bacteriana como fímbrias ou por lectinas dos fagócitos que atuam como receptores.

Tentativas de correlacionar os sorotipos individuais com os sítios de infecção ou com sintomas clínicos têm sido contraditórias. Muitos trabalhos, entretanto, mostram que o sorotipo K2 está entre os mais comuns tipos capsulares isolados entre pacientes com pneumonia, infecções urinárias e bacteremias (EDMONDSON *et al.*, 1980; PODSCHUN, 1990, *apud* PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

Devido suas propriedades endotóxicas, os lipopolissacarídeos presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas são considerados importantes em sepse. Os antígenos O dos lipopolissacarídeos de *Klebsiella spp* eram tidos como sendo mascarados pelos polissacarídeos da cápsula e assim não eram expostos nas superfícies. Estudos recentes, entretanto têm demonstrado a exposição desses antígenos em linhagens apresentando determinados sorotipos capsulares (TOMÁS *et al.* 1988; *apud* PODSCHUN & ULLMANN, 1998). O pequeno número de diferentes antígenos O de *Klebsiella* representa uma grande vantagem com respeito a sua aplicabilidade como vacina. Ao contrário dos antígenos K (capsulares), somente oito tipos de antígenos O são conhecidos, sendo O1 o mais comumente encontrado em isolados clínicos.

Como um primeiro passo no processo infeccioso, os microrganismos devem ficar o mais próximo possível da superfície mucosa do hospedeiro, mantendo esta

proximidade pela ligação com as células do hospedeiro. As propriedades de adesão das *Enterobacteriaceas* são geralmente mediadas por diferentes tipos de pili (OFECK & DOYLE, 1994 *apud* PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

Pili são demonstrados através de sua habilidade de aglutinar eritrócitos de diferentes espécies animais. Se a reação for inibida por D-manose, estas adesinas são designadas como hemaglutininas manose-sensíveis, se não houver inibição são consideradas manose resistentes (MSHA e MRHA) respectivamente (OTTOW, 1975, *apud* PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

Dos diferentes tipos de pili descritos em enterobactérias, dois são predominantes em *Klebsiella spp.* (OLD *et al.*, 1995): Pili tipo 1 são MSHA que aglutinam hemácias de cobaias. A relevância deste pili para a virulência bacteriana está em permitir a ligação da bactéria ao muco ou as células epiteliais dos tratos urogenital, respiratório e intestinal (VENEGAS *et al.*, 1995); pili tipo 3 aglutina hemácias que tenham sido tratadas com ácido tânico. Embora o nome hemaglutinação manose-resistente *Klebsiella like* (MR/K-HA), implique que este tipo de fímbria seja sintetizado somente por *Klebsiella spp.*, estudos têm demonstrado que o pili tipo 3 ocorre em muitos gêneros de enterobactérias (CLEGG & GERLACH, 1987). Estudos sorológicos têm mostrado uma considerável diversidade antigênica entre os pili do tipo 3 nos diversos gêneros de enterobactérias (OLD *et al.*, 1985). Linhagens de *K. pneumoniae* que expressam pili do tipo 3 aderem em células endoteliais e em células epiteliais do trato respiratório e urogenital (HORNICK *et al.*, 1992; TARKKANEN *et al.*, 1997).

A ligação a eritrócitos tratados com ácido tânico é inibida por espermidina, uma poliamina que também é secretada na urina (GERLACH *et al.*, 1989). Desde que a espermidina é exposta na superfície de eritrócitos lisados, tem sido sugerido que a

hemaglutinação MR/K é mediada por espermidina (GERLACH *et al.*, 1989). Isto pode explicar porque o pili do tipo 3 se liga a eritrócitos tratados com ácido tânico, mas não em eritrócitos não tratados.

Três novos tipos de adesinas foram descritas nos últimos tempos em *Klebsiella spp.*: uma adesina codificada por plamídio CF29K, que medeia a aderência em células humanas das linhagens intestinal-407 e CaCo-2 (DARFEUILLE-MICHAUD *et al.*, 1992). Este tipo de adesina parece ser idêntica a adesina CS31-A encontrada em linhagens de *E.coli* isoladas de diarreias (DI MARTINO *et al.*, 1995), e pertencente à família das adesinas K88. Dados sugerem que CF29K provavelmente seja um produto da transferência genética de determinantes de CS31A de *E.coli* para linhagens de *K. pneumoniae* no intestino humano (PODSCHUN & ULLMANN, 1998). O padrão de adesão agregativa em linhagens de células intestinais é mediado por outra adesina de *K. pneumoniae* que parece ser composta de material extracelular semelhante ao da cápsula (FAVRE – BONTE *et al.*, 1995). O terceiro tipo de fator de colonização do intestino humano é uma fímbria que tem sido chamada KPK-28 (DI MARTINO *et al.*, 1996). Este tipo de fímbria tem sido encontrada na maioria das linhagens produtoras de beta-lactamases do tipo CAZ- 5/SHV-4.

A primeira linha de defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores inclui, em adição à fagocitose por polimorfonucleares, o efeito bactericida do soro. A atividade bactericida do soro é mediada por proteínas do sistema complemento. Após a ativação em cascata estas proteínas se acumulam formando o complexo de ataque à membrana na superfície do microrganismo (TAYLOR, 1983; *apud* PODSCHUN & ULLMANN, 1998). Este complexo consiste das proteínas terminais do complemento C5b - C9, produzem um poro que atravessa a membrana externa de bactérias Gram negativas,

levando ao influxo de sódio e subsequente lise osmótica da bactéria (RAMM *et al.*, 1983; TAYLOR *et al.*, 1985).

A cascata do complemento pode ser ativada por dois mecanismos diferentes: a via clássica, que requer anticorpos específicos para ser ativada e a via alternativa que pode ser ativada na ausência de anticorpos. A via alternativa é um mecanismo da imunidade inata que protege o hospedeiro da invasão de microrganismo mesmo antes da produção de anticorpos específicos. Ambas as vias levam a ativação da proteína C3, que forma a opsonina C3b, resultando na formação do complexo terminal C5b- C9, que desempenha papel chave neste sistema de defesa (JOINER, 1988).

Microrganismos patogênicos desenvolvem estratégias para burlar a ação bactericida do soro. Muitas bactérias Gram-negativas comensais são sensíveis ao efeito bactericida do soro humano, enquanto linhagens patogênicas freqüentemente exibem propriedades de resistência ao soro (OLLING, 1977, *apud* POUDSCHUN & ULLMANN, 1998). Enterobactérias isoladas de casos clínicos freqüentemente mostram resistência ao soro; a capacidade de resistir ao soro tem sido correlacionada com o tipo de infecção e a severidade dos sintomas. Diferenças no grau de suscetibilidade à ação bactericida do soro podem determinar se a linhagem é hábil para infectar e o tempo que esta leva para provocar a infecção (POUDSCHUN & ULLMANN, 1998).

O crescimento das bactérias nos tecidos do hospedeiro é limitada não somente pelos mecanismos de defesa como também pelo suplemento de ferro disponível. O ferro é um fator essencial para o crescimento bacteriano (GRIFFITHS, 1987; *apud* POUDSCHUN & ULLMANN, 1998). O suplemento de ferro livre no tecido do hospedeiro é muito baixo, porque este elemento está ligado intracelularmente a proteínas como hemoglobina, ferritina, hemosiderina e mioglobina e extracelularmente

a proteínas ligadoras do ferro de alta afinidade, como lactoferrina e transferrina (BULLEN *et al.*, 1978; *apud* POUDSCHUN & ULLMANN, 1998).

Muitas bactérias para retirar ferro dos tecidos, secretam substâncias quelantes de ferro de alta afinidade e baixo peso molecular chamadas sideróforos que são capazes de competitivamente tirar o ferro das proteínas dos hospedeiros (POUDSCHUN & ULLMANN 1998).

Sob condições de deficiência de ferro, enterobactérias sintetizam uma variedade de sideróforos que pertencem a dois diferentes grupos químicos: hidroxamato e fenolato. No grupo fenolato o sideróforo mais conhecido é a enterobactina, também conhecida como enterocolina. Este sideróforo é o principal sistema de retirada de ferro de enterobactérias e são sintetizados por quase todos os isolados clínicos de *E.coli* e *Salmonella spp* (GRIFFITHS *et al.*, 1988; *apud* POUDSCHUN & ULLMANN 1998).

Entre os sideróforos do tipo hidroxamato, a aerobactina é um dos mais importantes. Em contraste com a enterobactina, a contribuição da aerobactina para a virulência das bactérias têm sido claramente demonstrada (DE LORENZO & MARTINEZ, 1988).

No gênero *Klebsiella spp*, a produção de ambas enterobactinas e aerobactinas têm sido demonstrada. Uma associação entre a síntese de aerobactina e virulência de linhagens de *Klebsiella* foi demonstrada por NASSIF e SANSONETTI (1986).

Dados sobre a incidência de linhagens de *Klebsiella* produtoras de aerobactina indicam que este sideróforo não desempenha um papel central na patogenicidade do gênero *Klebsiella* (POUDSCHUN & ULLMANN, 1998).

Como em muitas enterobactérias, e como tem sido especialmente bem estudado em *E.coli*, outros fatores de virulência têm sido demonstrados em *Klebsiella spp*. A

produção de citotoxinas, enterotoxinas e hemolisinas era relatada como tendo um papel menor na virulência de *K. pneumoniae*, entretanto trabalhos recentes têm apontado as citotoxinas e hemolisinas de *K. pneumoniae* como importantes fatores de virulência (SINGH *et al.*, 2000).

As infecções, com exceção da meningite neonatal e gastroenterites, são em sua maioria endógenas, isto é, a microbiota do indivíduo é capaz de estabelecer uma infecção quando ocorre comprometimento das defesas do hospedeiro (MURRAY, *et al.*, 2000).

A colonização renal é o fator predisponente à septicemia, devido à intensa vascularização desse órgão (TRASBULSI *et al.*, 1999).

A mortalidade associada à septicemia por bactérias Gram-negativas é influenciada pela fonte da infecção e pela doença subjacente do paciente, com incidência significativamente maior em indivíduos imunocomprometidos (MURRAY *et al.* 2000)

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Amostras

Foram estudadas 18 amostras isoladas de hemoculturas de 17 crianças apresentando diferentes tipos de patologias e submetidas a tratamento imunossupressor no ano de 2001, do Centro Infantil Dr. Domingos Boldrini (CIB) Campinas (SP) conforme distribuição encontrada no quadro 1. A classificação das amostras como ESBL (+) ou ESBL (-) foi realizada no Laboratório de Microbiologia Clínica do CIB.

Quadro 1. Amostras ESBL (+) e ESBL (-) isoladas de hemoculturas de pacientes imunossuprimidos utilizadas no presente estudo.

ESBL – Positivas		ESBL – Negativas	
Nº amostra	Bactéria	Nº amostra	Bactéria
804(1)*	<i>K. pneumoniae</i>	1747(14)*	<i>E. coli</i>
806(2)	<i>K. pneumoniae</i>	2113(15)	<i>E. coli</i>
1182(3)	<i>K. pneumoniae</i>	1158(16)	<i>E. coli</i>
1475(4)	<i>K. pneumoniae</i>	1219(17)	<i>K. pneumoniae</i>
1652(5)	<i>E. coli</i>	2362(18)	<i>K. pneumoniae</i>
1742(6)	<i>E. coli</i>		
1745(7)	<i>K. pneumoniae</i>		
1750(8)	<i>K. pneumoniae</i>		
2142(9)	<i>K. pneumoniae</i>		
2353(10)	<i>K. pneumoniae</i>		
2420(11)	<i>K. pneumoniae</i>		
2127(12)	<i>E.coli</i>		
294(13)	<i>E.coli</i>		

\* Amostras isoladas do mesmo paciente

## **4.2. Caracterização Bioquímica das amostras**

A identificação bioquímica das amostras foi inicialmente realizada no Laboratório de Microbiologia do CIB. Os testes bioquímicos utilizados foram: Tríplice Açúcar Ferro (TSI), Citrato, Uréia, Indol, Lisina, Fenilalanina, Ornitina e Arginina (KONEMAN *et al.*, 2001). O reisolamento das amostras foi realizado a partir do meio Mac Conkey e dos testes bioquímicos em meios de EPM (TOLEDO *et al.*, 1982a) Mili (TOLEDO, 1982b) e Citrato de Simmons (Difco®).

## **4.3. Determinação do Padrão de Resistência às Drogas Antimicrobianas e do Padrão ESBL(+) e ESBL (-)**

A determinação do padrão de resistência a antibióticos e detecção de ESBL foi realizada no Laboratório de Microbiologia Clínica do CIB, seguindo o método de Double-disc-synergy (DDS) de acordo com normas preconizadas pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002).

### **4.3.1. Teste de Double-disk-synergy (DDS)**

O teste de DDS é uma técnica qualitativa baseada no princípio do bloqueio da atividade enzimática das ESBL sobre drogas-chave, proposta por JARLIER (1988) *apud* BRADFORD (2001), baseado na metodologia de disco difusão de KIRBY-BAUER. Neste procedimento foram utilizados discos com drogas-chave isoladas e, em associação com drogas bloqueadoras de beta-lactamases como o ácido clavulânico. A presença de ESBL foi determinada pelo aumento de 5mm ou mais nos tamanhos dos

halos de inibição após a adição do inibidor. De acordo com o tamanho dos halos de inibição apresentados, as amostras foram classificadas em sensíveis, resistentes, ESBL(+) e ESBL(-), seguindo tabela padrão da NCCLS (2002), Figura1.

#### **4.3.2. Drogas Antimicrobianas**

Foram avaliadas dezessete (17) drogas antimicrobianas. Quadro 2.

As drogas-chave indicadas pela NCCLS para detecção de ESBL (+) em amostras clínicas utilizadas foram: Ácido Clavulânico + Amoxicilina, Aztreonam, Cefotaxima, Ceftazidime e Ceftriaxona.

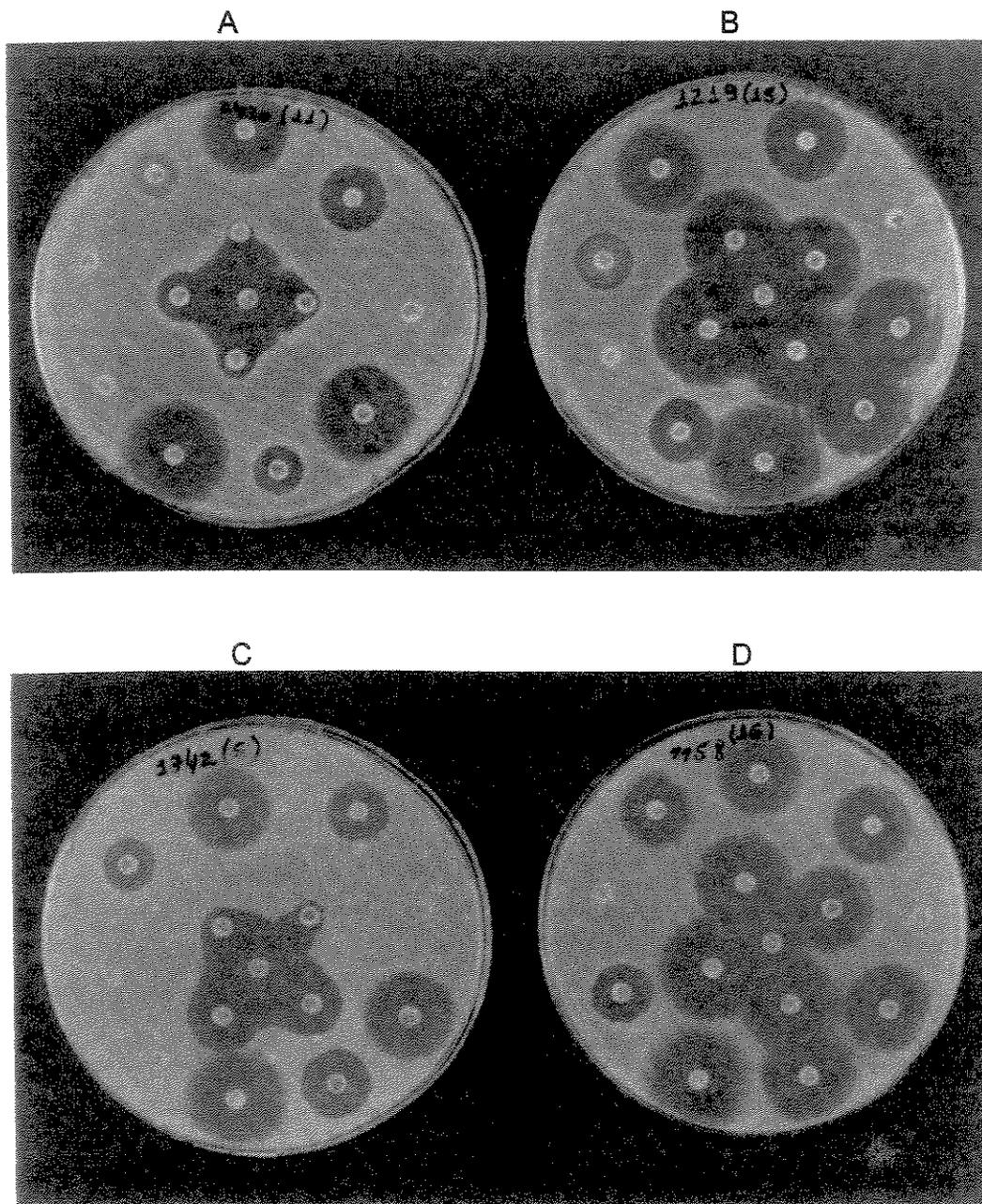


Figura 1. Determinação do padrão ESBL (+) e ESBL (-) através do teste de Double-disk synergism (DDS).

- 1.A - *K. pneumoniae* ESBL (+)
- 1.B - *K. pneumoniae* ESBL (-)
- 1.C - *E. coli* ESBL (+)
- 1.D - *E. coli* ESBL (-)

Quadro 2. Drogas antimicrobianas utilizadas na execução do teste de antibiograma e determinação do padrão ESBL(+).

Antibiótico	Sigla	Concentração/Disco( $\mu$ g)	Fabricante
Ácido Clavulânico + Amoxicilina	AMC	30	Cecon
Amicacina	AMI	30	Cecon
Ampicilina	AMP	10	Cefar
Ampicilina + Subactam	SBA	20	Cecon
Aztreonam	ATM	30	Cefar
Cefoxitina	CFO	30	Cefar
Cefalotina	CFL	30	Cefar
Cefepime	CPM	30	Cecon
Ceftazidime	CAZ	30	Cecon
Ceftriaxona	CRO	30	Cecon
Cefotaxima	CTX	30	Cefar
Ciprofloxacina	CIP	5	Cecon
Cloranfenicol	CLO	30	Cecon
Imipenem	IPM	10	Cefar
Levofloxacina	LVZ	5	Cefar
Piperaciclina + Tazobactam	TZP	110	Oxoid
Sulfazotrim	SUT	25	Cecon

#### **4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Antibiótico $\beta$ -lactâmico sobre amostras de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* ESBL (+) pelo método de diluições**

Para a realização deste experimento, as amostras de *K. pneumoniae* e *Escherichia coli* ESBL (+) foram previamente cultivadas em tubos contendo 3 mL de meio Brain Heart Infusion (BHI/Difco®), incubadas durante 18 horas a 37°C. Em seguida foram diluídas em salina estéril 0,15 M de modo a atingir a concentração de  $0,5 \times 10^8$  UFC/mL, sendo que 100  $\mu$ L dos inóculos foram então transferidos para tubos contendo 3 mL de meio Müller-Hinton, adicionado do antibiótico Ceftriaxona (CRO/Rocefim/Roche®) em concentrações que variaram de: 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256  $\mu$ g/mL, seguindo orientações de KONEMAN *et al.*, (2001) e do NCCLS (2002). Cada amostra e respectivas diluições foram testadas em duplicata. Como controle da eficácia da droga foi feito o cultivo das amostras ESBL (-), nas mesmas condições.

#### **4.5. Detecção de citotoxinas**

##### **4.5.1. Produção de Hemolisinas**

##### **4.5.1.1. Produção de hemolisina em placas de ágar-sangue em diferentes condições de aeração**

As bactérias foram cultivadas na presença e na ausência da dose subinibitória (100  $\mu$ g/mL) de ceftriaxona (determinada anteriormente pelo teste de diluição em

tubos), em placas de ágar-Müller-Hinton (Oxoid®), BHI e Lúria - Bertani (LA/Oxoid®) adicionadas de 5% de sangue desfibrinado (AUDREU *et al.*,1997). Os sangues utilizados foram de carneiro, eqüino e humano. As amostras foram inoculadas por picada diretamente do estoque ou após cultivo estático em caldo BHI, incubadas a 37°C, durante 24 horas. Um grupo de placas foi incubado em aerobiose e o outro em jarras de anaerobiose com envelope de anaerogen (Oxoid®), que gera uma atmosfera de 7% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, durante 24 horas. Após este tempo foi realizada a primeira leitura. Em seguida, as placas foram mantidas "overnight" a 4°C, após o que foi realizada a segunda leitura, para verificar a presença de hemólise. Como controle positivo e negativo foram utilizadas as amostras *E.coli* P46 e *E.coli* K12 (DH5α), respectivamente.

#### **4.5.1.2. Produção de hemolisina extra e intracelular em diferentes condições de aeração**

##### **4.5.1.2.1. Condições de cultivo**

As bactérias foram cultivadas em 10 mL de meio TSB (caldo trípico de soja/Oxoid®), BHI, BHI suplementado com 1% de glicose e 0,03% de L-Lisina, pH 6,9 e 7,4, respectivamente e, em meio Lúria Bertani tamponado com 2,8 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,1 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, adicionados ou não da dose subinibitória de Ceftriaxona, com agitação a 150 rpm e em cultura estática em jarras de anaerobiose contendo envelope de anaerogen, como citado anteriormente, durante 18 horas a 37°C. Em seguida foram

centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. Foram coletadas alíquotas de 500 µL dos sobrenadantes, que foram mantidas sob refrigeração até o momento do uso.

Os sedimentos obtidos após a centrifugação das culturas foram lavados duas vezes com tampão fosfato salina (PBS) 0,05 M, pH 7,4 e, em seguida sonicados em 3 ciclos de 10 segundos, em seguida centrifugados a 10.000 rpm, durante 10 minutos, sendo os sobrenadantes mantidos sob refrigeração até o momento do uso.

#### **4.5.1.2.2. Realização do teste**

Em uma parte dos sobrenadantes foi adicionado DTT (Dithiothreitol/Sigma®), na concentração de 1 µg/mL. Em seguida foram realizadas diluições seriadas em PBS pH 7,4 (0,05 M), volume a volume, em placas de microtitulação (Costar®), seguindo método descrito por BHAKDI *et al.* (1986). Após o que foram adicionados 50 µL de hemácias de carneiro, eqüinas e bovinas, lavadas e diluídas a 1% em PBS. As placas foram incubadas a 37°C em banho-maria, durante 1 hora. Depois incubadas a 4°C, "overnight". Os sobrenadantes dos sonicados foram testados, conforme descrito anteriormente.

## **4.5.2. Expressão de hemolisina**

### **4.5.2.1. Influência de íons, quelante de ferro e da aeração sobre a expressão de hemolisina ligada à célula.**

Para a realização deste experimento foi seguida metodologia descrita por BARATERA (2001), com modificações. Ao meio de cultura ágar – sangue (5% de sangue desfibrinado de carneiro ou de cavalo), foram adicionados íons como: cloreto férrico 5 mM ( $\text{FeCl}_3$ ), cloreto de cálcio 10 mM ( $\text{CaCl}_2$ ) e o quelante de ferro EDDA (ethylenediamine-di o- hydroxyphenol acetic acid /Sigma®) na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As amostras foram inoculadas por picada diretamente do estoque e as placas foram incubadas nas condições citadas no item 4.5.1.1. A primeira leitura foi realizada após 24 horas de incubação a 37°C e a segunda, após incubação a 4°C, “overnight”.

### **4.5.2.2. Influência de íons e de quelante de ferro sobre a expressão de hemolisina extra celular em diferentes condições de aeração**

#### **4.5.2.2.1. Condições de cultivo**

Para este experimento as amostras foram inoculadas em tubos contendo 10 mL de meio BHI suplementado com 1% de glicose e 0,03% de L-lisina, cloreto-férrico 5mM ( $\text{FeCl}_3$ ), cloreto de cálcio 10 mM ( $\text{CaCl}_2$ ) e o quelante de ferro EDDA na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Um grupo de tubos foi incubado em jarra de anaerobiose com envelope de anaerogen (Oxoid®), a 37°C, durante 18 horas. Outro grupo foi incubado em aerobiose, sob agitação a 150 rpm, a 37°C, por 18 horas. Em

seguida as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm, durante 10 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram conservados sob refrigeração até momento do uso.

#### **4.5.2.2. Realização do teste**

Os sobrenadantes obtidos foram testados para presença de hemolisina extracelular frente a hemácias de carneiro e eqüinas lavadas e diluídas a 1% com PBS 0,05 M pH 7,4 puro ou adicionado de cloreto de cálcio 10 mM (CaCl<sub>2</sub>) ou soro albumina bovina (BSA) na concentração de 1%. As diluições foram realizadas volume a volume, em placas de microtitulação. As placas foram incubadas a 37°C em banho-maria, durante 1 hora, após esse período foi realizada a primeira leitura visual. Em seguida, as placas foram incubadas a 4°C, "overnight", quando então foi realizada a última leitura.

#### **4.5.3. Detecção de citotoxinas em culturas de células**

##### **4.5.3.1. Cultivo das amostras**

Para verificar a produção de citotoxinas foram também testados diferentes meios de cultura. As bactérias foram cultivadas em 10 mL de meio TSB (caldo tríptico de soja/Oxoid®), BHI e BHI suplementado com 1% de glicose e 0,03% de L- lisina, pH 7,0, adicionados ou da dose subinibitória de Ceftriaxona, respectivamente, durante 18 horas a 37°C, sob agitação de 150 rpm. Em seguida as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm, durante 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram mantidos sob refrigeração até o momento do uso. Foram aplicados 100 µL dos sobrenadantes em

diluições seriadas em culturas de células Vero, HeLa e HT-29, para verificação dos efeitos citopático e citotóxico, conforme citado no item 4.5.3.5.

#### **4.5.3.2. Obtenção de extratos com mitomicina C**

Os extratos obtidos com mitomicina C foram preparados de acordo com indicação de BLANCO *et al.* (1990). As bactérias foram semeadas em 10 mL de TSB (pH 7,0), durante 5 horas a 37°C, sob agitação de 150 rpm. Em seguida foi adicionado a cada tubo 100 µL de mitomicina C, para uma concentração final de 1 µg/mL. As bactérias foram incubadas por um tempo adicional de 15 horas, nas mesmas condições citadas anteriormente. Após esse tempo, as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm, durante 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram testados em cultura de células Vero, para verificação de efeito citotóxico, conforme citado no item 4.5.3.5.

#### **4.5.3.3. Obtenção de extratos com polimixina B**

Os extratos obtidos pela polimixina B foram preparados de acordo com KARMALI *et al.* (1985). As bactérias foram cultivadas em 10 mL TSB (pH 7,0), durante 18 horas a 37°C sob agitação de 150 rpm. Em seguida as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos a 4°C. Os sedimentos obtidos foram lavados duas vezes com 5 mL de PBS 0,05 M pH 7,4. e, ressuspensos em 0,5 mL de polimixina B (0,1 mg/mL), e incubados por 30 minutos a 37°C em banho-maria. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, durante 10 minutos a 4°C. Dos sobrenadantes obtidos 100 µL foram aplicados em cultura de células Vero em diluições seriadas para verificação de efeito citotóxico, conforme citado no item 4.5.3.5.

#### 4.5.3.4. Preparo das culturas de células

As células utilizadas para este experimento foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Virologia, da Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas.

Células Vero (rim de macaco verde da África), HeLa (carcinoma de útero humano) e HT-29 (célula de adenocarcinoma de colon humano) foram mantidas em nitrogênio líquido, descongeladas em banho-maria a 37°C e, transferidas para garrafas de cultura de células contendo meio MEM (mínimo essencial de Eagle modificado/Nutricell®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB/Nutricell®) e 1% de solução de antibióticos contendo penicilina (100 UI/mL; Sigma®) e estreptomicina (250 µg/mL; Sigma®). O mesmo procedimento foi feito com as células HT-29, sendo substituído o meio MEM pelo MaCoy's (Nutricell®), específico para estas células. Os frascos de culturas foram incubados em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> até a formação do tapete celular. Após este período o meio de cultura foi descartado e, em seguida adicionado sobre o tapete de células, solução de ATV (associação Tripsina-Versene/Nutricell®) para desprendimento das mesmas, sendo estas ressuspensas em MEM ou MaCoy's acrescidos de 10% de SFB e 1% de solução de antibióticos para uma concentração final estimada em 2x10<sup>5</sup> células/mL. Em microplacas de 96 orifícios (Costar®), foram distribuídos 100 µl de células em cada cavidade. As placas foram mantidas em estufa sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas, ou até a formação do tapete de células.

#### **4.5.3.5. Ensaio de citotoxicidade**

Os meios de cultura das placas com células Vero, HeLa e HT-29, foram removidos, e adicionado em cada orifício 100 µL de meio MEM e MaCoy's, respectivamente. Em seguida foram adicionados 100 µL dos sobrenadantes das culturas bacterianas em diluições seriadas na razão dois. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A leitura dos resultados foi realizada com, 12, 24, 48 e 72 horas após a incubação, com auxílio de microscópio invertido (Axiovert-Zeiss®).

#### **4.6. Teste de resistência ao soro humano normal**

Para o teste de resistência ao soro humano normal realizado, conforme PELKONEN & FINE (1987), foram coletadas amostras de sangue de 10 pessoas saudáveis em condições assépticas em tubos sem anticoagulante. As amostras foram deixadas por 30 minutos a temperatura ambiente e, 4 horas a 4°C para retração do coágulo. Em seguida os soros foram coletados, com auxílio de pipetas automáticas e ponteiros estéreis, colocados em tubos em microtubos cônicos e centrifugados a 4.000 rpm, durante 3 minutos. Os soros obtidos foram reunidos em "pool", alicotados e mantidos, em freezer a -20°C até o momento do uso.

As amostras bacterianas foram cultivadas em tubos contendo 3 mL de BHI com ou sem antibiótico (100 µg/mL de ceftriaxona), durante 18 horas a 37°C, sob agitação a 150 rpm. Em seguida, foram diluídas a 1:100 nos mesmos meios e mantidas sob agitação até atingir a fase logarítmica. Após esse tempo, as culturas foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 minutos, e os sedimentos ressuspensos em PBS

estéril pH 7,4 (0,05 M) para uma concentração de  $10^7$  bactérias/mL. As suspensões bacterianas foram distribuídas em microplacas, seguida pela adição do soro humano para concentração final de 50%. As placas foram agitadas levemente e incubadas a 37°C, em estufa.

O crescimento das amostras foi medido nos intervalos de tempo de 0,30, 60,90 120, 150 e 180 minutos, em leitor de ELISA (LABSYSTEMS MULTISKAN®-type348) a 620 nm.

Foram utilizados como branco: PBS e soro diluído em PBS nos primeiros orifícios. Como controle foi utilizada *E. coli* K12 (DH5 $\alpha$ ) frente ao soro aquecido a 56°C, durante 30 minutos e, sem aquecimento.

#### **4. 7. Produção de aerobactina**

##### **4.7.1. Cultivo das amostras bacterianas**

As amostras de *K. pneumoniae* e *E.coli* ESBL (+) e ESBL (-), foram cultivadas em meio mínimo M9 líquido, suplementado com 200  $\mu$ M de quelante de ferro  $\alpha$ - $\alpha'$ - dipiridil (Sigma®), e 100  $\mu$ g/mL de ceftriaxona para cultivo das amostras ESBL (+). As amostras foram incubadas a 37°C por 24 horas sob agitação a 150 rpm. A cepa indicadora da produção de aerobactina *E.coli* LG 1522 foi cultivada em meio LB por 24 horas a 37°C.

#### **4.7.2. Realização do teste**

A pesquisa da produção de aerobactina foi realizada segundo CARBONETTI *et al.* (1986), utilizando-se o meio mínimo M9, suplementado com 200  $\mu$ M de quelante de ferro  $\alpha$ - $\alpha'$ -dipiridil (Sigma<sup>®</sup>), e 1% de ágar. As placas com meio M9 foram semeadas por inundação com 100 $\mu$ l da cepa *E.coli* LG 1522, indicadora da produção de aerobactina. As placas foram secas a 37°C, durante 15 minutos, em estufa, sendo em seguida as amostras semeadas por "spot". Após incubação a 37°C, durante 24 horas. As amostras secretoras de aerobactina foram identificadas pela formação de halo de crescimento da cepa indicadora ao redor do "spot". Como controle positivo e negativo foram utilizadas as amostras de *E.coli* LG 1315 e *E.coli* K12 C600, respectivamente.

#### **4.8. Teste de adesão em linhagens de células**

##### **4.8.1. Cultivo das amostras**

Para realização deste teste as bactérias foram cultivadas em 3 mL de BHI adicionado ou não de 100  $\mu$ g/mL de ceftriaxona, durante 18 horas em estufa a 37°C.

##### **4.8.2. Preparo da cultura de células**

Células HeLa e HT-29, mantidas em nitrogênio líquido, foram descongeladas em banho-maria a 37°C e em seguida, transferidas para garrafas de cultura de células contendo 8,5 mL de meio MEM ou McCoy's, suplementado com 10% de SFB

(Nutricell®) e 1% de solução de antibióticos contendo penicilina (100 U/mL; Sigma®) e estreptomicina (250 µg/mL; Sigma®). Os frascos de cultura foram incubados em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até a formação do tapete celular. Após este período o meio de cultura foi descartado e, em seguida adicionado sobre o tapete de células, solução de ATV para desprendimento das células, sendo estas ressuspendidas em MEM ou MaCoy's, acrescido de 10% de SFB e 1% de solução de antibióticos. Em microplacas de 24 orifícios (Costar®), contendo lamínulas foram distribuídas as soluções de células em volume de 1 mL ( $2,5 \times 10^5$  células /mL) em cada cavidade. As placas foram incubadas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até a formação de tapete semiconfluente.

#### **4.8.3. Realização do teste**

As culturas de células foram lavadas três vezes com PBS 0,01 M, pH 7,4, em seguida foram adicionados aos orifícios 950 µL de MEM ou MaCoy's acrescido de 2% de SFB contendo ou não 1% de D-manose, a cada orifício foram adicionados em duplicata 50 µL do cultivo bacteriano. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, durante 1 hora. Após esse período as placas foram lavadas oito vezes com PBS 0,01 M, pH 7,4, sendo as cavidades preenchidas com 1 mL de MEM ou MaCoy's acrescido de 2% de SFB contendo ou não 1% D-manose. Então foram novamente incubadas por um tempo adicional de 3 horas nas mesmas condições, citadas anteriormente, sendo a seguir lavadas dez vezes com PBS. Após o que foi adicionado 1 mL de metanol em cada orifício e deixado reagir por 10 minutos. Em seguida, o metanol foi descartado e as células foram coradas com MayGrunwald

(1:2 em tampão Sorensen), durante 10 minutos, lavadas com água destilada e coradas com Giemsa (1:5 em tampão Sorensen) por 10 minutos. As células foram, novamente, lavadas com água, deixadas secar a temperatura ambiente, sendo as lamínulas, contendo as células, retiradas das placas e colocadas em lâminas de microscopia. A leitura foi realizada em microscópio óptico em objetiva de imersão.

#### **4.9. Sepsis experimental em camundongos**

Para este experimento foram utilizados 5 camundongos Balb/c machos com 4 a 6 semanas de idade, para cada amostra. Foram selecionadas 2 amostras ESBL (+), uma de *K.pneumoniae* (amostra 2420/11) e outra de *E.coli* (1742/6) e 2 amostras ESBL (-), sendo uma de *K.pneumoniae* (1219/17) e outra de *E. coli* (1747/14), com base no resultado dos testes de hemólise. Estas bactérias foram cultivadas em 10 mL de TSB, pH 7,4 a 37°C, sob agitação de 150 rpm, durante 18 horas. Em seguida as culturas foram diluídas com salina estéril 0.15 M para uma concentração final equivalente à escala 2 de MacFarland ( $3 \times 10^8$  ufc/mL).

Os animais de cada grupo foram inoculados com 0,5 mL das diluições por via intraperitoneal (v.i.p.). Como controle negativo foi utilizada uma *E.coli* K12 (DH5 $\alpha$ ), cultivada como as demais amostras. Os animais foram observados durante 7 dias.

#### **4.10. Detecção da produção de enterotoxina termo-estável (STa)**

O ensaio em camundongos recém-nascidos foi realizado segundo DEAN *et al.* (1972). Os sobrenadantes das culturas bacterianas foram preparados em TSB, coletados e testados no mesmo dia, ou foram estocados a 4°C até o momento do uso.

Para a realização do teste, em 1 mL do sobrenadante de cada cultura foi adicionado 1 gota de azul de Evans a 2% (Sigma®). Em seguida 0,1 mL de cada preparação foi inoculado por via intragástrica, com auxílio de uma cânula de silicone. Para cada amostra analisada foram inoculados 3 animais. Os animais foram mantidos a temperatura ambiente, durante 3 horas, em seguida foram sacrificados com éter, e a quantidade de líquido acumulado no intestino, determinada pela relação do peso do intestino com o peso da carcaça.

#### **4.11. Estudo histológico dos órgãos de camundongos infectados pelas amostras de *K. pneumoniae* e *E.coli* ESBL (+) e ESBL (-)**

##### **4.11.1. Cultivo das amostras**

As amostras bacterianas utilizadas para este experimento, a forma de cultivo, assim como as diluições, foram realizadas de forma semelhante ao descrito no item 4.9.

Foram utilizados dois camundongos Balb/c machos com 4 a 6 semanas de idade, para cada amostra, nos quais foram inoculados 0,5 mL das respectivas diluições pela v.i.p. Os animais foram sacrificados com 12 e 24 horas após infecção.

#### **4.11.2. Coleta de material**

Os camundongos foram anestesiados com 0,05 mL/kg de Virbaxil 2% (Virbac/SP) e 1,0 mL/kg de Francotar (Virbac/SP), pela v.i.p. Após a anestesia os camundongos tiveram a cavidade torácica exposta e foram perfundidos, via ventrículo esquerdo, com 30 mL de paraformaldeído 4% (Sigma®), em PBS 0.1 M, pH 7,4, durante 15 minutos.

Foram retirados de cada animal o fígado, rins, baço, pulmão e cérebro. Estes órgãos foram seccionados em cortes de 3 mm de espessura e mantidos imersos em paraformaldeído por um período adicional de 12 horas, para processamento histotécnico.

#### **4.11.3. Processamento e coloração**

Os fragmentos foram desidratados em gradiente crescente de etanol, diafanizados e incluídos em parafina (Histosec-Merck). Cortes histológicos de 5 µm foram coletados em lâminas sinalizadas e, após desparafinização e hidratação, coradas com hematoxilina-eosina e por Giemsa. Os cortes histológicos foram analisados em microscópio óptico com aumentos de 10, 20 e 60 vezes. O estudo histopatológico foi realizado pelo Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas (SP).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Perfil Bioquímico das Amostras de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* ESBL (+) e ESBL (-) isoladas de hemocultura

As bactérias utilizadas neste estudo tiveram a sua identificação confirmada através dos testes bioquímicos: motilidade, fermentação de carboidratos e produção de gases em TSI, degradação do citrato, metabolismo da lisina, fenilalanina, ornitina, arginina e produção de indol.

Tabela 1. Perfil Bioquímico das Amostras

Meios/Testes	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
TSI	A/A	A/A
Citrato	+	-
Gás	+	+/-
Indol	-	+
Uréia	+	-
Fenilalanina	-	-
Lisina	+	+/-
Motilidade	-	+

A/A = superfície ácida e base ácida

+ = degradação do substrato

- = não degrada o substrato

## **5.2. Determinação do Padrão de ESBL (+) e ESBL (-) das amostras de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* isoladas de hemocultura**

A tabela 2 apresenta o perfil de sensibilidade e resistência a diferentes drogas antimicrobianas das bactérias estudadas no presente trabalho, classificadas conforme o NCCLS e considerando halos de inibição com diâmetros para ceftazidima  $\leq 22\text{mm}$ ; ceftriaxona  $\leq 25\text{mm}$  e para cefotaxima ou aztreonam de  $\leq 27\text{mm}$ , como indicadores da produção de ESBL.

## **5.3. Determinação da concentração inibitória mínima de ceftriaxona para amostras de *K. pneumoniae* e *E.coli* $\beta$ -Lactamases espectro estendidas.**

Todas as amostras ESBL (+) de *K.pneumoniae* e *E. coli*, submetidas à ação do antibiótico  $\beta$ -lactâmico ceftriaxona (CRO), em diferentes concentrações, cresceram até a concentração de  $128 \mu\text{g/ml}$ , em um período de 24 horas. Consideramos essa a concentração inibitória mínima (CIM ou MIC). Determinamos então, como concentração subinibitória de ceftriaxona para essas amostras  $100\mu\text{g/ml}$ .

Tabela 2. Perfil de sensibilidade e resistência às drogas antimicrobianas das amostras de *K.pneumoniae* e *E.coli* ESBL (+)

Amostras ESBL - positivas			
BACTÉRIA	Nº da AMOSTRA	SENSIBILDADE	RESISTÊNCIA
<i>K.pneumoniae</i>	804	IPM,CIP, LVX.	AMP,CFL,CPM,SBA,AMI,CAZ, ATM,CTX,CRO,AMC,GEN,SUT CFO,TZP.
<i>K.pneumoniae</i>	806	IPM, LVX,SUT,CIP,AMI	SBA,CPM,GEN,CRO,ATM,CTX, CAZ, AMC e CFO.
<i>K.pneumoniae</i>	1182	IPM, CIP,SUT, LVX,AMI	GEN,AMP,SBA,CFL,CRO,CAZ CPM,CTX,ATM,AMC,TZP, CFO.
<i>K.pneumoniae</i>	1475	IPM, CIP, LVX,CLO	SBA,AMP,AMI,CFL,GEN,SUT CPM,CAZ,CRO,ATM,CTX,AMC CFO,TZP.
<i>Escherichia coli</i>	1652	IPM,CLO, LVZ,AMI,CIP	CFL,CPM,AMP, SBA,TZP,CAZ, ATM,CRO,AMC,CTX e CFO.
<i>Escherichia coli</i>	2127	IPM,CLO, LVZ,CIP	CFL,CPM,AMP,SBA,TZP,CAZ, ATM,CRO,AMC,CTX,CFO e AMI
<i>Escherichia coli</i>	1742	IPM, LVX,CIP, AMI.	SUT,SBA,CFL,AMP,CRO,CPM CTX,ATM,AMC,CAZ, CFO.
<i>K.pneumoniae</i>	1745	IPM,CLO,AMI,GEN LVX,CIP,SUT,SBA.	AMP,CFL,ATM,CRO,CAZ,CTX AMC,CPM,TZP,
<i>K.pneumoniae</i>	1750	IPM, LVX,CLO,CFO,CIP	AMP,AMI,GEN,SUT,SBA,CAZ ATM,CTX,CRO,AMC,CFL,CPM
<i>K.pneumoniae</i>	2142	IPM,CIP,CFO, LVX,CLO	CPM,SUT,AMP,AMI,GEN,CFL SBA,ATM,CTX,CRO,CAZ,AMC TZP
<i>K.pneumoniae</i>	2353	IPM,CIP,CLO,CFO, LVX	CPM,SUT,AMP,AMC,SBA,CFL AMI,TZP,ATM,CRO,CTX,CAZ
<i>K.pneumoniae</i>	2420	IPM,CIP,CFO, LVX	AMI,GEN,CFL,AMP,SBA,CLO SUT,ATM,CRO,CTX,CAZ,AMC TZP,CPM
<i>Escherichia coli</i>	294	IPM,CLO,AMI	CFL,AMP,CPM,AMP,SBA,TZP, CAZ,ATM,CRO,AMC,CTX,CFO CIP e LVZ

Tabela 3. Perfil de sensibilidade e resistência às drogas antimicrobianas das amostras de *K.pneumoniae* e *E.coli* ESBL (-)

Amostras ESBL - negativas			
BACTÉRIA	Nº da AMOSTRA	SENSIBILDADE	RESISTÊNCIA
<i>Escherichia coli</i>	1747	IPM,CPM,LVX,CFO,CIP,CFL, CRO,ATM,TZP,CTX,CAZ,AMC	CLO,AMI,GEN,SUT,AMP
<i>Escherichia coli</i>	2113	AMC,CFO,AMI,CIP,IPM,CTX,LVX SBA,CPM, CLO, CAZ, CRO, TZP CFL	AMP,SUT
<i>K.pneumoniae</i>	2362	AMI,CIP,CLO,LVX,CPM,SUT,IPM CBA,ATM,CAZ,CRO,TZP,CTX,GEN	CFO,CFL,AMP
<i>K.pneumoniae</i>	1219	IPM,LVX,SBA,AMI,ATM,CAZ,CRO CTX,CFO,GEN,SUT,CIP,CPM,CFL, TZP, AMC	AMP
<i>Escherichia coli</i>	1158	AMI, CFO, GEN,CPM,CIP,IPM,LVX, CFL, TZP, CAZ, ATM, CRO, CTX	CBA,AMP,SUT

## 5.4. Produção de Citotoxinas

### 5.4.1. Hemolisinas

#### 5.4.1.1. Detecção em placas de ágar-sangue em diferentes condições de aeração

Meio base Müller-Hinton:

1. Adicionado de antibiótico em aerobiose – 10 amostras ESBL (+) produziram hemólise total em hemácias de eqüinos e 4 foram hemolíticas para hemácias de carneiro, nenhuma atividade hemolítica foi detectada para hemácias humanas.

2. Na ausência de antibiótico em aerobiose - o número de amostras ESBL(+) hemolíticas caiu para 6, sobre hemácias eqüinas e, permaneceu 4 para hemácias de carneiro. Não houve atividade hemolítica sobre hemácias humanas.
3. Na ausência de antibiótico em aerobiose - apenas uma amostra ESBL (-) apresentou atividade hemolítica para hemácias eqüinas, nenhuma atividade hemolítica para hemácias de carneiro e humana foi observada.
4. Em anaerobiose na presença do antibiótico - duas amostras ESBL (+) foram hemolíticas para hemácias de eqüino e nenhuma foi hemolítica para hemácias de carneiro e humanas.
5. Em anaerobiose na ausência do antibiótico - nenhuma cepa ESBL (+) apresentou atividade hemolítica com as hemácias utilizadas.
6. O controle positivo (amostra P46), produziu hemólise total, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose, com halos maior e igual a 1mm, respectivamente.

Meio base LA:

1. Na presença e ausência da dose subinibitória em aerobiose - 9 amostras ESBL (+) foram hemolíticas para hemácias eqüinas; para hemácias de carneiro e humanas não foi observada atividade hemolítica.
2. Em anaerobiose, na presença e ausência da dose subinibitória apenas uma amostra ESBL (+) foi hemolítica para hemácias eqüinas. Com sangue de carneiro e humano, não foi observada atividade hemolítica.

3. As amostras ESBL (-) não apresentaram efeito hemolítico com nenhuma das condições citadas anteriormente.

Meio base BHI:

1. Com ou sem a dose subinibitória com ou sem aeração - as amostras ESBL (+) não apresentaram atividade hemolítica para hemácias de carneiro e humanas; com sangue de equino, somente duas amostras ESBL (+) foram hemolíticas.
2. As amostras ESBL (-) não foram hemolíticas em nenhuma das condições (aerobiose ou anaerobiose), conforme mostrado na tabela 4. O controle positivo manteve a atividade hemolítica observada anteriormente.

#### **5.4.1.2. Detecção de Hemolisina Extra e Intracelular em Sobrenadantes das Culturas e dos Sonicados das Amostras ESBL (+) e ESBL (-)**

Foi observada atividade hemolítica nos sobrenadantes das culturas de todas as amostras de *E. coli* ESBL (+) e (-) realizadas em BHI suplementado, sobre hemácias de equino.

Os títulos obtidos foram de 1/4, passando, geralmente, a 1/8 após incubação "overnight". A adição de DDT não influenciou a resposta.

Não foi observada atividade hemolítica nos sobrenadantes dos sonicados, nos diferentes meios utilizados.

Não foi detectada atividade hemolítica nos sobrenadantes de culturas realizadas na presença da dose subinibitória do antibiótico.

Tabela.4 - Correlação da produção de hemolisina pelas amostras ESBL (+) e ESBL (-) em placas de ágar-sangue em aerobiose e anaerobiose sob o efeito ou não da dose subinibitória de Ceftriaxona

Hemácias/Meio	AEROBIOSE		ANAEROBIOSE	
	Nº de amostras positivas	Nº de amostras negativas	Nº de amostras positivas	Nº de amostras negativas
Eqüino/MH+AB	10 ESBL (+)	3 ESBL (+)	2 ESBL(+)	11ESBL (+)
Eqüino/MH	6 ESBL (+) 1 ESBL (-)	7 ESBL (+) 4 ESBL (-)	0 0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)
Eqüino/LA + AB	09 ESBL (+)	4 ESBL (+)	1 ESBL (+)	12 ESBL (+)
Eqüino/LA	09 ESBL (+) 0	4 ESBL (+) 5 ESBL (-)	1 ESBL (+) 0	12 ESBL (+) 5 ESBL (-)
Eqüino/BHI + AB	0	13 ESBL (+)	2 ESBL (+)	11 ESBL (+)
Eqüino/BHI	0 0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)	0 0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)
Carneiro/MH + AB	4 ESBL (+)	09 ESBL (+)	0	13 ESBL (+)
Carneiro/MH	4 ESBL (+) 0	09 ESBL (+) 5 ESBL (-)	0 0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)
Carneiro/LA + AB	0	13 ESBL (+)	0	13 ESBL (+)
Carneiro/LA	0 0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)	0 0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)
Carneiro/BHI + AB	0	13 ESBL (+)	0	13 ESBL (+)
Carneiro/BHI	0 0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)	0 0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)
Humano/MH + AB	0	13 ESBL (+)	0	13 ESBL (+)
Humano/MH	0 0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)	0 0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)
Humano/LA + AB	0	13 ESBL (+)	0	13 ESBL (+)
Humano/LA	0 0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)	0 0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)
Humano/BHI + AB	0	13 ESBL (+)	0	13ESBL (+)
Humano/BHI	0 0	13ESBL (+) 5 ESBL (-)	0 0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)

MH= Müller-Hinton; AB=Antibiótico; LA= Luria-Bertani-ágar;

### **5.4.1.3. Expressão de Hemolisina pelas Amostras ESBL (+) e ESBL (-)**

#### **5.4.1.3.1. Influência de íons, quelante de ferro e da Aeração na Expressão de Hemolisinas em placas de ágar-sangue.**

Todas as amostras ESBL (+) (100%), na presença de EDDA, em aerobiose e anaerobiose, foram hemolíticas para hemácias de eqüinos, apresentando halos de hemólise total (1mm). Todas as amostras ESBL (-) apresentaram atividade hemolítica na presença de EDDA sobre hemácias eqüinas, em aerobiose; já a ausência de oxigênio inibiu a atividade hemolítica destas amostras, mesmo na presença de EDDA, para estas hemácias. Tal resultado evidencia que as amostras ESBL (-) produziram hemolisina em meio carente de ferro, mas que a expressão desta era dependente do oxigênio. Com sangue de carneiro em anaerobiose, a maioria das amostras ESBL (+) (70%) foi hemolítica na presença de EDDA, porém o mesmo não foi observado em aerobiose, pois nenhuma cepa foi hemolítica, isto é, o oxigênio inibiu a ação hemolítica destas amostras sobre hemácias de carneiro. Já as amostras ESBL (-) (100%), não apresentaram atividade hemolítica com hemácias de carneiro, nestas condições.

A presença de cloreto férrico inibiu a produção de hemolisina em todas as amostras ESBL (+) e ESBL (-), em condições de aerobiose e anaerobiose, para os dois tipos de hemácias utilizadas. Já a presença de íons cálcio estimulou a expressão da atividade hemolítica das amostras ESBL (+), em aerobiose, sobre hemácias eqüinas, mas não para hemácias de carneiro; em anaerobiose, a influência do  $\text{CaCl}_2$  foi praticamente nula para ambas as hemácias. As amostras ESBL (-) não foram

hemolíticas na presença do  $\text{CaCl}_2$  para nenhuma das hemácias, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose (Tabela 5 e 6).

**Tabela 5 – Influência de íons e quelante de ferro na produção de hemolisina em placas de ágar-sangue em anaerobiose.**

SANGUE/ÍONS	Nº AMOSTRAS/ HEMÓLISE POSITIVA	Nº AMOSTRAS/ HEMÓLISE NEGATIVA
Eqüino + $\text{CaCl}_2$	1 ESBL (+)	12 ESBL (+) 5 ESBL (-)
Eqüino + EDDA	13 ESBL (+) 1 ESBL (-)	4 ESBL (-)
Eqüino + $\text{FeCl}_3$	0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)
Cameiro + $\text{CaCl}_2$	1 ESBL (+)	12 ESBL (+) 5 ESBL (-)
Cameiro + EDDA	7 ESBL (+)	6 ESBL (+) 5 ESBL (-)
Cameiro ++ $\text{FeCl}_3$	0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)

**Tabela 6 – Influência de íons e do quelante de ferro na produção de hemolisina em placas de ágar-sangue em aerobiose**

SANGUE/ÍONS	Hemólise Positiva/ nº amostras	Hemólise Negativa/ nº amostras
Eqüino + $\text{CaCl}_2$	12ESBL (+)	1 ESBL (-) 5 ESBL (-)
Eqüino + EDDA	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)	0 0
Eqüino + $\text{FeCl}_3$	0 0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)
Cameiro + $\text{CaCl}_2$	0 0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)
Cameiro + EDDA	0 0	13 ESBL (+) 5 ESBL (-)
Cameiro + $\text{FeCl}_3$	0 0	13 ESBL (+) 5 ESBL(-)

#### 5.4.1.3.2. Influência de Íons e de quelante de ferro sobre a expressão da hemolisina extracelular em aerobiose

Todas as amostras ESBL (+) e ESBL (-) de *E.coli* apresentaram atividade hemolítica nos sobrenadantes de culturas, quando cultivadas em meio BHI suplementadas e adicionadas de cloreto de cálcio. O título foi de 1/4 para hemácias eqüinas e 1/2 para hemácias de carneiro.

As culturas realizadas em BHI adicionado de EDDA ou cloreto de ferro, não apresentaram atividade hemolítica no sobrenadante. (Tabela 7)

Em sobrenadantes das amostras de *E. coli* (nº 5, 6, 12 e 13) e *K. pneumoniae* (nº 1, 9 e 11) ESBL (+) e *E.coli* ESBL (-), cultivadas em BHI contendo EDDA e diluídos com PBS adicionado de cálcio, o título obtido foi de 1/16. A adição de BSA no PBS não alterou a atividade hemolítica dos sobrenadantes (Tabela 8).

**Tabela 7. Influência de íons e quelante de ferro na expressão da hemolisina extracelular em sobrenadantes das culturas das amostras ESBL (+) e ESBL (-).**

	Meios		
	BHIS+FeCl <sub>2</sub>	BHIS+CaCl <sub>2</sub>	BHIS+EDDA
Hemácias	Amostras Positivas/Título		
Eqüino	0	5, 6, 12, 13, 14, 15, 18 (1/4)	0
Carneiro	0	5, 6, 12, 13 14, 15, 18 (1/2)	0

**Tabela 8. Expressão da hemolisina extracelular em sobrenadantes de culturas das amostras ESBL+ e ESBL-**

	Meios/Diluentes			
	Amostras positivas			
	BHIS+ClCa2 PBS+ClCa2	BHIS+EDDA PBS+ClCa2	BHIS+ClCa2 PBS+BSA	BHIS+EDDA PBS +BSA
Hemácias Equino	0	1, 5, 6, 9, 11, 12, 13 15, 16, 18 (1/16)*	0	0

\* Título obtido após incubação overnight a 4°C.

## 5.4.2. Detecção de Citotoxinas em Culturas de Células

### 5.4.2.1. Detecção de Citotoxinas nos Sobrenadantes das Amostras

O sobrenadante de algumas amostras, obtidos após cultivo em caldo TSB (item 4.5.3.1), causaram discreto efeito citotóxico, como alongamento das células e perda de junção, este efeito foi detectado apenas com 72 horas após incubação e o título foi de 1/2 para 01 amostra de *E. coli* ESBL (-) e de 1 /4 com 01 amostra de *E. coli* e 06 amostras de *K. pneumoniae* ESBL (+).

### 5.4.2.2. Extração com Mitomicina C

Empregando os extratos obtidos pelo tratamento com mitomicina C, em um primeiro experimento, foi observado efeito citotóxico semelhante ao causado pela toxina termo lábil (LT) de *E. coli*, ou seja, mudança na forma da célula. Este efeito foi observado com duas amostras ESBL (+) e com uma amostra ESBL (-) de *K. pneumoniae*. Em um segundo experimento com estes extratos, não foi observado

efeito citotóxico sobre células Vero. Estes extratos não foram testados em outros tipos de culturas de células.

#### **5.4.2.3. Extração com Polimixina B**

Com extratos obtidos pelo tratamento com polimixina B não foi observado efeito citotóxico em células vero. Estes extratos não foram testados em outros tipos celulares.

#### **5.4.2.4. Influência da Dose Subinibitória de Ceftriaxona sobre a produção de Citotoxinas em Culturas de Células Vero, HeLa e HT-29**

Neste experimento observou-se uma monocamada aparentemente normal, com muitas células mortas, células arredondadas, com perda de junção intercelular e alterações na membrana celular. O título foi de 1/8 em células Vero e de 1/4 em células HeLa para a maioria das amostras. Não foram observadas diferenças entre as amostras ESBL (+) e ESBL (-), quanto ao tipo de efeito citopático apresentado e nem quanto ao título, em um período de 72 horas, nestas células.

Em células HT-29, observou-se arredondamento, vacuolização e granulação. Foi observada diferença de uma casa no título entre amostras de *K. pneumoniae* ESBL (+) quando cultivadas na presença da dose subinibitória do antibiótico ceftriaxona, título 1/8, em relação às amostras de *K. pneumoniae* ESBL (-), que apresentaram título 1/4.

### **5.5. Resistência à Atividade Bactericida do Soro Humano Normal pelas Amostras de *K.pneumoniae* e *E.coli* ESBL (+) e ESBL (-)**

Foram consideradas como resistentes as amostras que apresentaram aumento de absorvância no período de 3 horas e, sensíveis aquelas que tiveram diminuição da absorvância no mesmo intervalo de tempo. Não foram verificadas diferenças entre as amostras ESBL (+) cultivadas na presença ou ausência do antibiótico, pela média de três observações. As bactérias que apresentaram crescimento equivalente à amostra controle (K12/DH5 $\alpha$ ), quando cultivada na presença do soro inativado, foram consideradas resistentes, enquanto as que mostraram crescimento equivalente ou menor à amostra controle, na presença do soro normal (ativo), foram consideradas sensíveis. Entre as amostras ESBL (+), 60% foram resistentes e entre as ESBL (-), apenas uma amostra foi resistente (20%). Para a representação gráfica foram escolhidas aleatoriamente duas amostras de *K. pneumoniae*, uma resistente (ESBL+) e outra sensível (ESBL-) ao soro, sendo o mesmo critério adotado para as amostras de *E.coli*, conforme mostrado nas figuras 2 e 3.

### **5.6. Produção de Aerobactina**

Todas as amostras de *K.pneumoniae* e *E.coli* (100%) submetidas ao teste de produção de aerobactina foram positivas, isto ficou comprovado pelo crescimento da amostra reveladora LG1522 em volta dos inóculos.

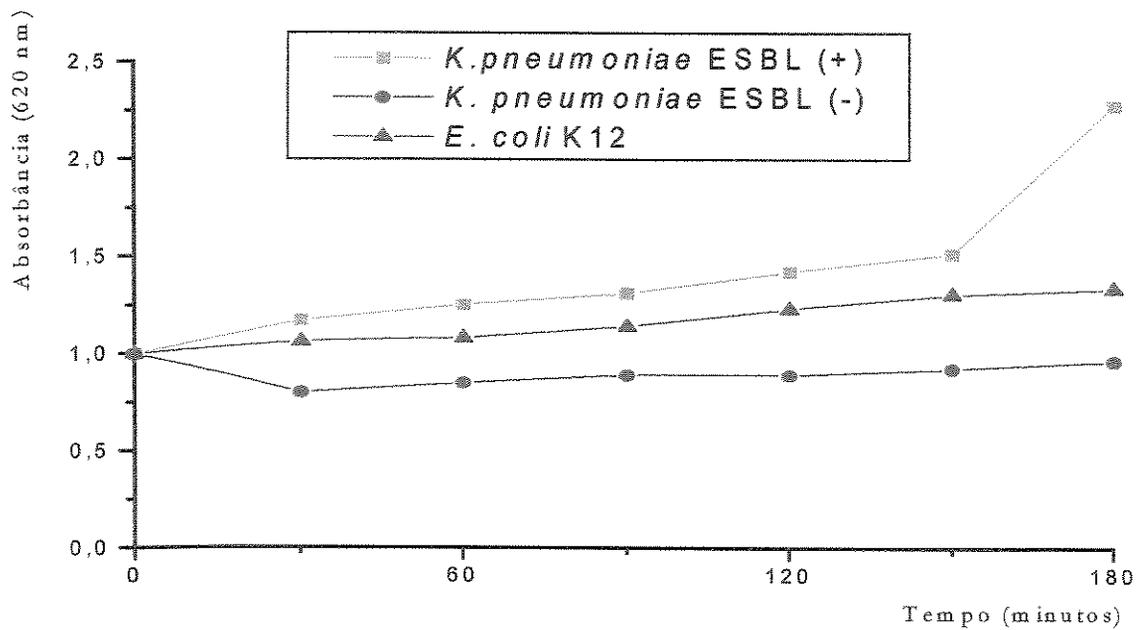


Figura 2. Efeito bactericida de 50% do soro humano normal sobre amostras representativas de *K. pneumoniae* ESBL (+) e ESBL (-) e *E. coli* K12.

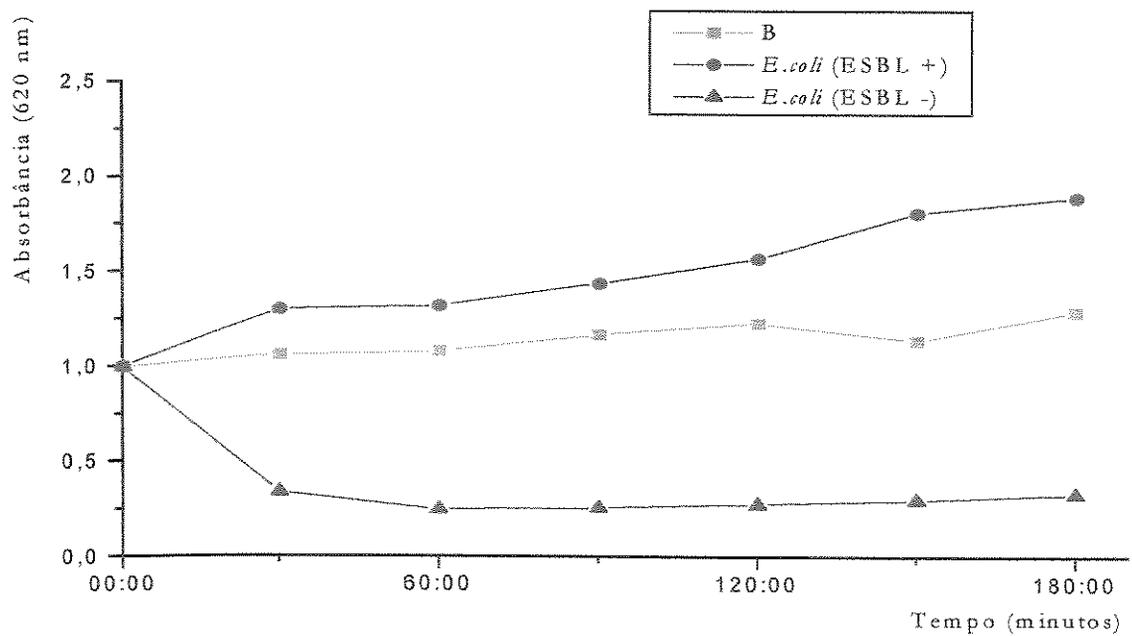


Figura 3. Efeito bactericida de 50% do soro humano normal sobre amostras representativas de *E. coli* ESBL (+) e ESBL (-) e *E. coli* K12.

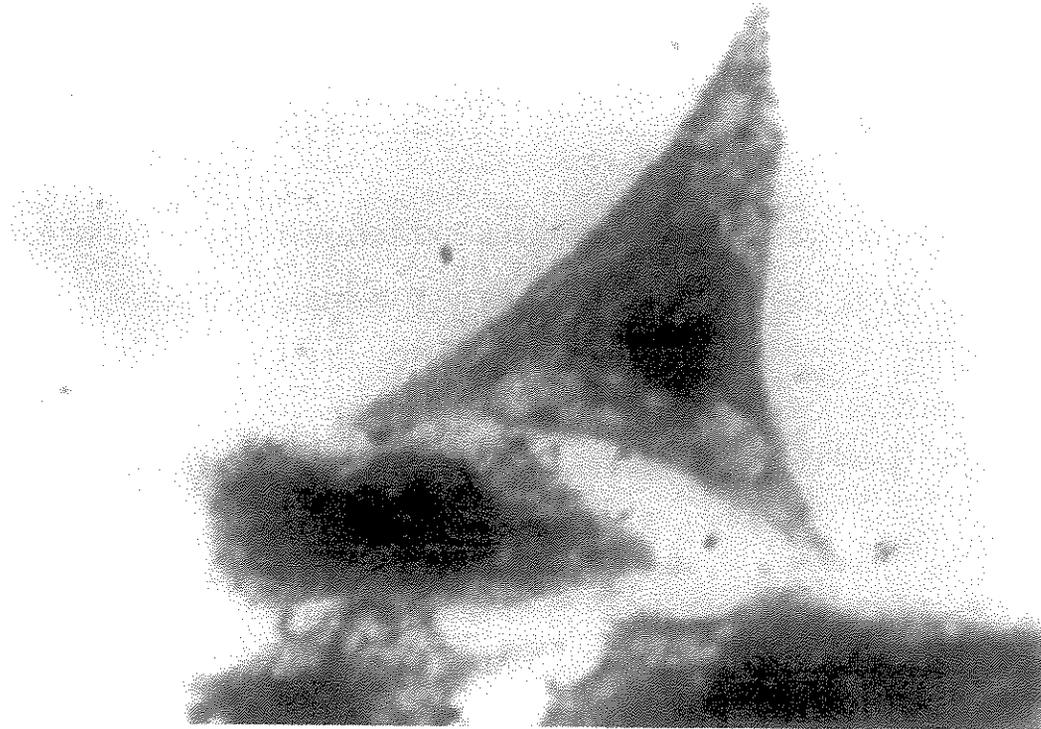
### 5.7. Adesão em Células HeLa e HT-29

Foram observados três tipos de adesão nas amostras de *K. pneumoniae* e *E.coli* estudadas: difusa, localizada e agregativa. Os teste de adesão foram feitos na presença e ausência de D- manose, para verificar, quais tipos de fímbrias estavam envolvidas na ligação das amostras às células (Tabela 9 e Figuras 4, 5, 6 e 7).

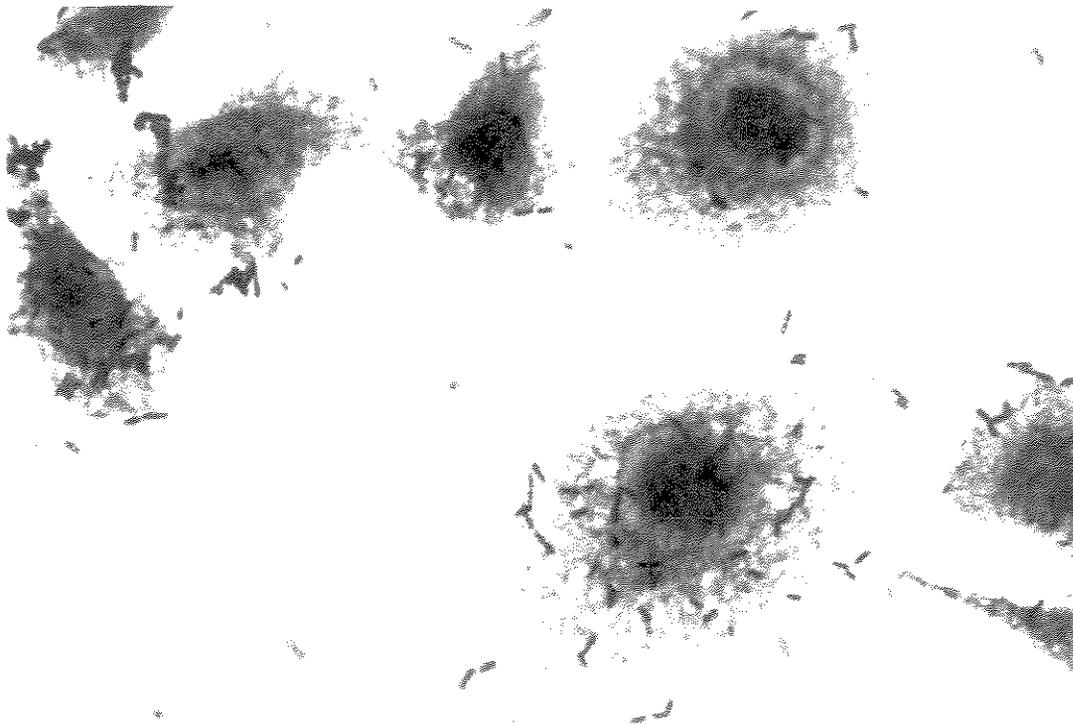
Tabela 9. Padrão de adesão das amostras de *K. pneumoniae* e *E.coli* ESBL+ e ESBL em células HeLa

	Amostras ESBL (+) / Tipo de Adesão		Amostras ESBL (-) / Tipo de Adesão		
	MS	MR	MS	MR	
<i>K.pneumoniae</i> – 804	AG	AG	<i>E.coli</i> - 1747	ND	ND
<i>K.pneumoniae</i> – 306	AG	AG	<i>E.coli</i> – 2113	AG	-
<i>K.pneumoniae</i> – 1182	AG	AG	<i>K.pneumoniae</i> - 2362	ND	ND
<i>K.pneumoniae</i> – 1475	AG	AG	<i>K.pneumoniae</i> – 1219	AG	AG
<i>E.coli</i> - 1742	AG	AG	<i>E.coli</i> – 1158	ND	ND
<i>E.coli</i> – 1652	AL	AL			
<i>K.pneumoniae</i> – 1745	AL	AL			
<i>K.pneumoniae</i> – 1750	AG	AG			
<i>K.pneumoniae</i> - 2142	ND	ND			
<i>K. pneumoniae</i> – 2353	AG	AG			
<i>K.pneumoniae</i> - 2420	AD	AD			
<i>E.coli</i> – 2127	AG	AG			
<i>E.coli</i> – 2294	AD	AD			

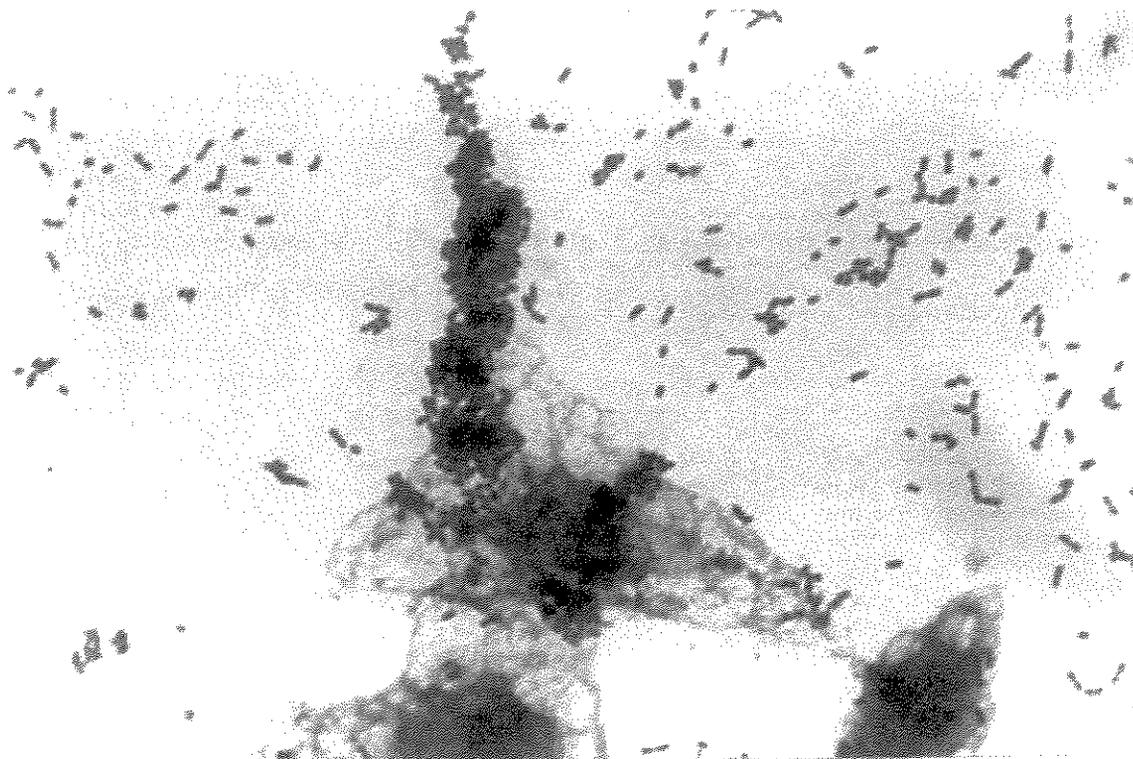
ND= Não determinada; AG= Adesão agregativa; AL = Adesão localizada; AD = Adesão difusa; MS = Manose sensível; MR = Manose resistente; (-) = adesão inibida pela manose.



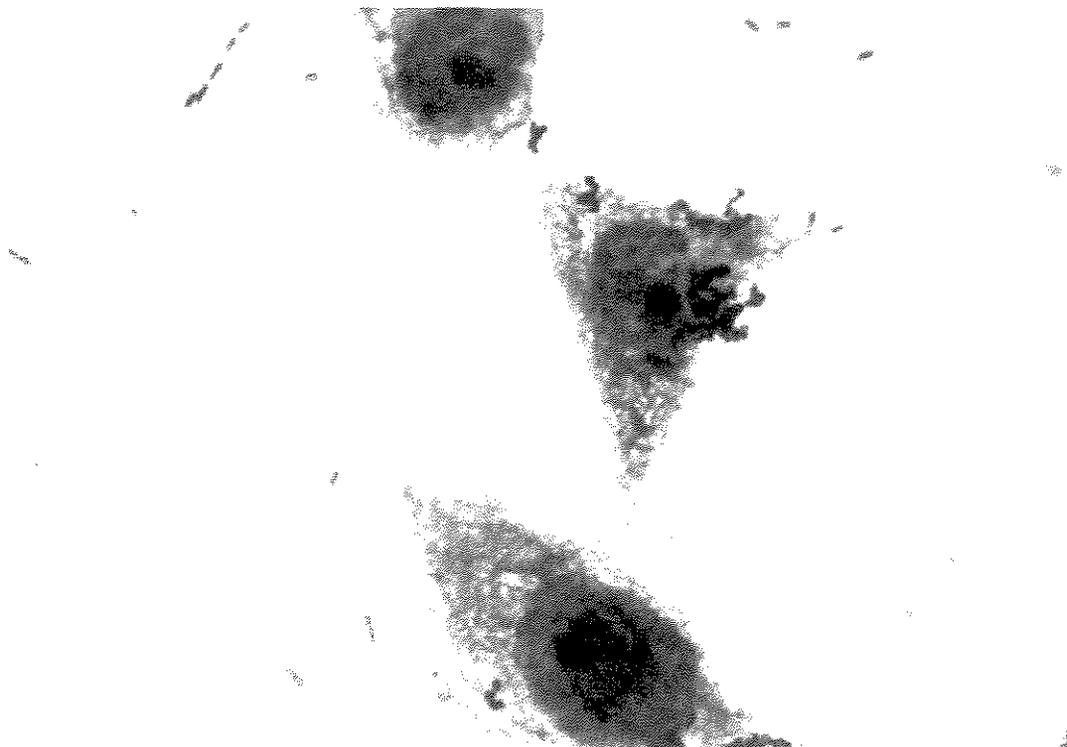
**Figura 4. Células HeLa controle (aumento de 1.000 x)**



**Figura 5. Adesão difusa-like em células HeLa - *E.coli* ESBL (+) (aumento de 1.000 x)**



**Figura 6. Adesão agregativa em células HeLa – *E.coli* ESBL (+) (aumento de 1.000 x)**



**Figura 7. Adesão localizada-like em células HeLa - *E.coli* ESBL (+) (aumento de 1.000 x)**

## 5.8. Teste de Patogenicidade

Todas as amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* ESBL (+) e (-) utilizadas nesse teste foram patogênicas, provocando a morte de 60 a 80% dos animais inoculados no intervalo de 12 a 48 horas (Tabela 10).

Tabela 10. Teste de patogenicidade em camundongos inoculados com as amostras ESBL (+) ESBL (-)

Amostra*	N° de animais inoculados	N° de animais mortos	Tempo (horas)
<i>K. pneumoniae</i> (2420) ESBL(+)	05	04	48
<i>K. pneumoniae</i> (1219) ESBL (-)	05	04	48
<i>E. coli</i> (1742) ESBL (+)	05	02	48
<i>E. coli</i> (1747) ESBL (-)	05	04	48
<i>E.coli</i> K12(DH5 $\alpha$ )	05	0	0

\* Dose utilizadas 0,5 mL ( $3 \times 10^9$  ufc/mL).

## 5.9. Detecção de Enterotoxina Termo-Estável

O teste para detecção da enterotoxina STa realizado em camundongos recém-nascidos, foi negativo para todas as amostras, sendo a relação peso do intestino pelo peso da carcaça menor que 0,08.

#### **5.10. Estudo Histológico dos Órgãos de Animais submetidos à infecção por amostras de *K.pneumoniae* e *E.coli* ESBL (+) e ESBL (-)**

Não foram observadas diferenças quanto às alterações histopatológicas nos órgãos coletados dos camundongos infectados pelas amostras ESBL (+) e ESBL (-). Os resultados observados são apresentados a seguir:

##### **Amostra 1742 [*E.coli* ESBL (+)]**

###### Camundongo sacrificado após 12 horas de inoculação:

Fígado - presença de esteatose micro e macro goticular (metabolismo de lipídios e glicídios alterados), vacúolos pequenos nos hepatócitos, provavelmente, devido ao acúmulo de líquido intracelular. Com a coloração de GIEMSA, foram observados ninhos de hepatócitos lesados com bactérias;

Pulmão - sem alteração;

Baço-Hiperplasia da polpa branca sem centro germinativo;

Rim - Necrose tubular aguda (acúmulo intracitoplasmático relacionado com balanço hidrolítico);

Cérebro – As células, que dão noção de localização ao animal, estavam aumentadas, mas com aspecto normal.

###### Camundongo sacrificado após 24 horas de inoculação:

Fígado - Em cortes corados por GIEMSA foi observado presença de infiltrado linfocitário com bactérias, hepatócitos lesados com bactérias e ninhos de células com

corpúsculo apoptótico, também observados com a coloração de hematoxilina-eosina (HE);

Rim - Necrose tubular aguda; cariorex das células tubulares com descamação para o lúmen; sinal de regeneração: áreas com mitose, presença de células com dois núcleos, indicando que houve agressão;

Pulmão - Hemorrágico, pneumonite crônica linfocitária leve;

Baço - Hiperplasia de polpa branca mais discreta que no animal sacrificado com 12 horas;

Cérebro - sem alterações.

#### **Amostra 1747 [E.coli ESBL (-)]**

##### Camundongo sacrificado após 12 horas de inoculação:

Fígado - Em cortes corados com GIEMSA foi observada presença de hepatócitos lesados com bactérias. Com a coloração de hematoxilina –eosina, foi observada esteatose e congestão intensa, baixa concentração de linfócitos;

Rim - Presença de necrose tubular aguda; presença de células binucleadas e alterações metabólicas;

Pulmão - estava igual ao do animal inoculado com a cepa 1742/12horas;

Baço - Hiperplasia de polpa branca;

Cérebro - Presença de células da glia (aumento focal de pequenas células da glia).

##### Camundongo sacrificado após 24 horas de inoculação:

Fígado - Presença de focos de infecção nos lóbulos com infiltrado leucocitário e alta concentração de linfócitos, agressão distal, esteatose discreta. Coloração com GIEMSA, hepatócitos lesados com bactérias;

Rim - Necrose tubular aguda igual ao do animal sacrificado com 12 horas;

Pulmão e Cérebro - iguais ao animal anterior;

Baço - Hiperplasia de polpa branca com centro germinativo incipiente.

**Amostra 2420 [K.pneumoniae ESBL (+)]**

Camundongo sacrificado após 12 horas de inoculação:

Fígado - Presença de células inflamatórias no espaço lobular sem agressão, discreta esteatose, congestão leve. Coloração com GIEMSA, foi observada vacuolização dos hepatócitos;

Rim - Necrose tubular aguda;

Pulmão e Cérebro -: sem alterações;

Baço - Hiperplasia de polpa branca com presença de centro germinativo, bactérias em superfície, congestão leve, exposição dos sinusóides.

Camundongo sacrificado após 24 horas de inoculação:

Fígado - Congestão moderada e baixa esteatose. Na coloração com GIEMSA, foi detectado infiltrado linfocitário com bactérias;

Rim - Necrose tubular aguda, presença de bactérias. Com a coloração de GIEMSA, foram detectadas na região tubular bactérias no sangue;

Pulmão - Hemorrágico, pneumonite crônica linfocitária leve;

Baço - Semelhante ao do animal sacrificado com 12 horas.

**Amostra 1219 [*K.pneumoniae* ESBL (-)]**

Camundongo sacrificado após 12 horas de inoculação:

Foram detectadas as mesmas alterações do animal inoculado com a cepa 2420 (*K.pneumoniae* ESBL+) após 12 horas de inoculação.

O segundo animal deste grupo morreu antes de completarem as 24 horas após inoculação.

## 6.DISSCUSSÃO

As  $\beta$ -lactamases de amplo espectro (ESBLs) surgiram inicialmente em bacilos Gram-negativos na Europa e foram encontrados logo em seguida nos Estados Unidos. Atualmente são detectadas em todo o mundo. Embora essa resistência seja mais comum em *K. pneumoniae* ela é transferível para outros gêneros, inclusive para *Escherichia coli* (JACOBY, 2000; PATTERSON, 2000). As enterobactérias que produzem ESBLs são tipicamente resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas de amplo espectro e as penicilinas de amplo espectro. São também resistentes ao aztreonam e ao monobactam (SANDERS *et al.*, 1993).

Algumas amostras que produzem ESBLs são suscetíveis às cefamicinas, cefoxitina e cefotetan. Entretanto, há um número cada vez maior de relatos indicando a coexistência de  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC, que são resistentes às cefamicinas (JACOBY & HAN, 1996, *apud* PATTERSON, 2000). As fluoroquinolonas podem ser úteis quando os microrganismos são suscetíveis a esses agentes, porém muitos isolados de bactérias Gram-negativas que produzem ESBLs são também resistentes as fluoroquinolonas. Normalmente, a resistência a fluoroquinolonas não é mediada por plasmídeos e, a presença deste tipo de resistência em bacilos Gram-negativos que produzem ESBLs é provavelmente multifatorial. Entretanto, já existe relato de resistência à fluoroquinolona em *K. pneumoniae* mediada por plasmídeos (PATTERSON, 2000).

Amostras de *K. pneumoniae* e *E.coli* que produzem ESBLs podem ser clinicamente resistentes à terapia com penicilina, cefalosporinas ou aztreonam, apesar da aparente suscetibilidade para alguns destes agentes. Algumas destas amostras

mostram halos de inibição com tamanho abaixo dos da população suscetível normal, mas acima do tamanho estabelecido para certas cefalosporinas de amplo espectro ou aztreonam. Em todas as linhagens produtoras de ESBLs o diâmetro do halo para uma ou mais cefalosporinas de amplo espectro, deve aumentar na presença do ácido clavulônico, que é um inibidor de  $\beta$ -lactamases. Para todas as linhagens confirmadas como produtoras de ESBLs, a interpretação do teste deve ser referido como resistentes para todas as penicilinas, cefalosporinas e aztreonam (NCCLS,2002). Em função do grande número de isolados clínicos de *K.pneumoniae* e *E.coli* ESBL+ e, sabendo que os genes que codificam estas enzimas são carregados por grandes plasmídeos de resistência, que poderiam carrear outros genes, investigamos a relação da resistência com a virulência nestas amostras.

Iniciamos a pesquisa dos fatores de virulência das amostras ESBL (+) e ESBL (-) avaliando o potencial das amostras para produção de hemolisinas.

Hemolisinas formam uma família de toxinas líticas que podem desempenhar importante papel na patogênese de doenças. Linhagens de *E.coli* hemolíticas produzem alfa e beta - hemolisinas, que são secretadas ou estão associadas com a célula (CHART *et al*, 1998). Atualmente estão descritas quatro tipos de hemolisinas de *E.coli* : i)  $\alpha$  - hemolisina, uma macromolécula de constituição parcialmente protéica, termo lábil que é liberada pela célula e está relacionada as infecções extra intestinais; ii)  $\beta$  - hemolisina, que tem atividade ligada à parede bacteriana; gama- hemolisina produzida por mutantes resistentes ao ácido nalidíxico é extra - celular e, tem atividade hemolítica restrita a alguns tipos de hemácias como cavalo, cobaia e carneiro (SMITH, 1963, *apud* PARREIRA, 1998). O quarto tipo de hemolisina foi descrito por BEUTIN *et al.* (1988), e foi designada de enterohemolisina (EHly). É produzida na fase

estacionária do crescimento bacteriano, sendo detectada apenas em placas de ágar-sangue que contenham eritrócitos lavados com tampão PBS (CATANI, 1999).

Pouco era conhecido da atividade hemolítica do gênero *Klebsiella*, sendo *K. pneumoniae* descrita como não hemolítica para hemácias humanas (SMITH & NGUI-YEN, 1980, *apud* ALBESA *et al.*, 1985). ALBESA *et al.* (1989), descreveram a atividade hemolítica destas bactérias sobre eritrócitos de coelho em placas. Um efeito hemolítico menor foi observado sobre eritrócitos de carneiro, cães, humano e de camundongos, com a hemolisina purificada de *K. pneumoniae* (ALBESA *et al.*, 1985, *apud* BARBERIS *et al.*, 1986). BARBERIS *et al.* (1986), ao purificarem a hemolisina de *K. pneumoniae* descreveram a detecção de duas frações com atividade hemolítica, com peso estimado em 19.000 Daltons e outra com 8.400 Daltons em cromatografia, que foram denominadas de klebolisinas.

Testamos o potencial das amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* ESBL (+) e ESBL (-) quanto à capacidade de produzir hemolisina, em diferentes meios e condições de cultivo, frente sangue de equino, carneiro e humano. Os resultados obtidos em placas de ágar-sangue mostraram que todas as amostras ESBL (+) foram hemolíticas e que, sua atividade hemolítica era modulada pelo meio, condições de cultivo, e pela sensibilidade das hemácias em teste. A dose subinibitória do antibiótico foi estimulante para produção da hemolisina na presença do oxigênio para hemácias eqüinas em meio Muller – Hinton e Luria – Bertani. A ausência de oxigênio diminuiu a síntese da hemolisina, mesmo na presença do antibiótico. Indicando que a presença do oxigênio era necessária para a produção da hemolisina.

O quelante de ferro EDDA teve efeito melhor que a dose subinibitória do antibiótico, pois suplantou a ausência do oxigênio, estimulando a produção da

hemolisina para as amostras ESBL (+) também em anaerobiose sobre hemácias eqüinas. A adição de EDDA nos meios também favoreceu a atividade hemolítica de 7 amostras de *K. pneumoniae* ESBL (+) sobre hemácias de carneiro em anaerobiose, não sendo observado o mesmo efeito em aerobiose. Todas as amostras ESBL (-) estudadas foram hemolíticas para hemácias eqüinas em meios carentes de ferro em aerobiose. Porém, em anaerobiose somente uma amostra de *K.pneumoniae* ESBL (-) manteve atividade hemolítica para hemácias eqüinas, revelando que a ausência do oxigênio era um fator limitante para a produção da hemolisina por estas amostras, mesmo em meios carentes de ferro.

ALBESA *et al.* (1985), analisando as hemolisinas de *K.pneumoniae* concluíram que estas eram lábeis ao oxigênio, como era a Streptolisina O de amostras de *Streptococcus*. Por outro lado CHART *et al.* (1998), pesquisando a produção de hemolisinas por linhagens de *E.coli* enterohemorrágicas (EHEC-EHly), em placas de ágar-sangue verificaram que o máximo de atividade hemolítica produzida era obtida numa atmosfera de 8% de dióxido de carbono, 40% de hidrogênio e 52% de nitrogênio, sugerindo que um componente do ar estava inibindo a produção da hemolisina nestas amostras; utilizando redutores do oxigênio como DTT, mostrou que o oxigênio não inibia a produção da hemolisina; sugeriu que talvez a porcentagem de dióxido de carbono, hidrogênio e nitrogênio tenha influenciado na expressão da hemolisina. Nos experimentos realizados por ALBESA *et al.* (1985), foi observada atividade hemolítica também em placas de ágar-sangue em aerobiose. Na opinião destes pesquisadores a hemólise ocorreu porque as amostras de *K. pneumoniae* entraram em contato com as hemácias enquanto cresciam ocorrendo lise antes da inativação pelo oxigênio.

Os resultados revelaram que a atividade hemolítica destas amostras foi reduzida pela ausência do oxigênio, talvez a tensão reduzida de oxigênio encontrada em placas de ágar-sangue fosse mais favorável para a produção e expressão desta(s) hemolisina(s). Portanto, condições de estresse como carência de ferro e a presença de antibiótico associada com baixa tensão de oxigênio foram as melhores condições encontradas para a produção e expressão destas hemolisinas. CHART *et al.* (1998), observaram que amostras de *E.coli* enterohemorrágica (EHEC-EHly), quando cultivadas em meios adicionados de EDDA, tinham suas atividades hemolíticas aumentadas. CATANI (1999), não observou aumento significativo na produção de enterohemolisina para amostras de *E.coli*, quando cultivadas na presença de EDDA.

CHART *et al.* (1998), também observaram que amostras de *E.coli* enterohemorrágica (EHEC-EHly), perdiam a capacidade hemolítica quando cultivadas na presença de  $FeCl_3$ . Os mesmos resultados foram obtidos por BARATÉLA *et al.* (2001), quando testaram a atividade hemolítica de amostras de *Plesiomonas shigelloides*.

Em nossos experimentos a adição de cloreto de ferro ( $FeCl_3$ ), as placas de ágar-sangue inibiu totalmente a atividade hemolítica das amostras, em aerobiose e anaerobiose. De onde se pode concluir que as atividades hemolíticas das amostras em estudo eram reguladas pelo ferro, ou seja, sua presença inibia a produção e sua ausência estimulava, assim como a hemolisina de *Plesiomonas shigelloides* e *E.coli* enterohemorrágica.

Os resultados observados com a adição de cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ) variaram de acordo com as condições de cultivo. Em aerobiose 80% das amostras ESBL+ foram hemolíticas para hemácias eqüinas, enquanto em anaerobiose apenas 10% destas

amostras foram hemolíticas tanto para hemácias eqüinas quanto para hemácias de carneiro. Em aerobiose não foi observada hemólise para eritrócitos de carneiro na presença do cálcio com nenhuma das amostras. ALBESA *et al.* (1985), verificaram que o título da hemolisina purificada de *K. pneumoniae* diminuía na presença de cátions divalentes como  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{BaCl}_2$  de forma dependente da concentração e do pH do meio. CHART *et al.* (1998), observaram que a ação hemolítica da hemolisina de EHEC-EHly, era cálcio independente, diferentemente da atividade da  $\alpha$ - hemolisina de *E.coli*. Foi sugerido que cátions divalentes podem reagir com grupos sulfidríla na molécula da hemolisina impedindo a hemólise dos eritrócitos (OBERLEY & DUNCAN, 1971, *apud* ALBESA *et al.*, 1985). Pode ser que em anaerobiose o cálcio tenha reagido com os grupos sulfidríla livres na molécula da hemolisina impedindo a ligação com as hemácias eqüinas, diminuindo o número de amostras hemolíticas.

Os resultados obtidos com os sobrenadantes de cultura indicaram que a hemolisina produzida pelas amostras de *K. pneumoniae*, não foi exportada para o meio, ou que a alta tensão de oxigênio as inativou. ALBESA *et al.* (1985), quando verificaram a atividade hemolítica de *K. pneumoniae* em meio líquido, observaram baixa atividade hemolítica, sendo esta atividade aumentada quando as culturas foram tratadas com 2-mercaptoetanol, uma substância que quebra pontes de dissulfeto expondo grupos sulfidríla; estes resultados indicaram que a(s) hemolisina(s) de *K.pneumoniae* eram thiol-ativadas.

Os resultados observados indicam que, possivelmente, as amostras de *K.pneumoniae* ESBL (+) em estudo produziram mais que uma hemolisina sendo uma lábil ao oxigênio e outra não. A produção de hemolisina pelas amostras ESBL (-), só foi detectada quando estas foram cultivadas em aerobiose em meio carente de ferro. Em

todos os experimentos realizados para verificar a produção e expressão das hemolisinas, as hemácias eqüinas foram as mais sensíveis. ALBESA *et al.* (1985), em seus experimentos verificaram que as hemácias de coelho eram mais sensíveis ao efeito das klebolisinas (hemolisinas de *Klebsiella*), que outros tipos de hemácias, já SINGH *et al.* (1999), observaram atividade hemolítica de amostras de *K. pneumoniae* sobre hemácias de cobaias.

Dados da literatura apontam que *K.pneumoniae* possui três tipos de citotoxinas que constituem um dos principais fatores de virulência desta espécie (SINGH & SHARMA, 2001), também existem dados na literatura sobre a enterotoxina termo-estável de *K. pneumoniae* com propriedades semelhantes a enterotoxina termo-estável (ST) de *E.coli*, ou seja, baixo peso molecular, resistência a variações de pH, a tratamentos enzimáticos e a altas temperaturas (KLIPSTEIN *et al*, 1983).

Analizamos o potencial para produção de citotoxinas das amostras ESBL (+) ESBL (-) testando inicialmente, os sobrenadantes das culturas feitas em TSB sem adição de antibiótico em culturas de células Vero, Hela e HT-29. Observamos alterações morfológicas como, arredondamento, granulação, vacuolização, com os sobrenadantes de ambos os tipos de amostras, em 72 horas, estes efeitos foram dose dependente e o título alcançado foi de 1/4.

Com os extratos obtidos com mitomicina C apenas duas amostras foram positivas, apresentando o mesmo título e efeitos citopáticos que os encontrados com os sobrenadantes das culturas. A mitomicina C tem sido utilizada na extração de toxinas de *E.coli*, com um aumento de até 100 vezes na produção de verotoxinas (VT) e LT (toxina termolábil), quando empregadas na concentração de 1 µg/ mL (GEMSKI *et al.*, 1987; al- JUMAILI *et al.*, 1992; *Apud* CATANI, 1999). A mitomicina C tem também

sido utilizada para a extração do fator necrosante citotóxico (CNF) (BLANCO *et al.*, 1988; BLANCO *et al.*, 1992, *apud* CATANI, 1999). PARREIRA (1998) utilizou mitomicina C para extração de VT em amostras de *E.coli* isoladas de galinhas com Síndrome da Cabeça Inchada (SCI), e não detectou aumento de título em culturas de células.

Não observamos efeitos citopáticos com os extratos de polimixina B nas culturas de *K.pneumoniae* e *E.coli*. Estes resultados divergem dos encontrados por SINGH *et al.* (1999) e SINGH *et al.* (2000), quando analisaram o efeito de sobrenadantes de cultura, extratos de polimixina e sobrenadantes de sonicados de *K.pneumoniae* sobre células Vero e MDBK; estes pesquisadores observaram arredondamento, granulação e vacuolização, seguidos de morte celular em intervalo de tempo de 6 a 48 horas com os três tipos de preparações, como foi encontrado neste estudo em células Vero, HeLa e HT-29 em período de 72 horas. Os títulos obtidos variaram de 1/2 a 1/8 com todas as preparações, e com todos os tipos celulares usados. A explicação para este fato se encontra nos trabalhos de SINGH *et al.* (1999), que mostraram que sobrenadantes de cultura de *Klebsiella* apresentavam apenas 15,13% do total de atividade citotóxica de uma cultura de *Klebsiella*, revelando que as citotoxinas de *Klebsiella* estavam ligadas à célula, como em *E.coli*, *Shigella* e *Salmonella*. Ainda segundo estes pesquisadores, extratos de polimixina continham cerca de 5,5 vezes mais citotoxicidade que os sobrenadantes de culturas e, continham 92% da citotoxicidade presente em lisados celulares, mostrando o potencial da polimixina B para liberação extracelular de citotoxinas ligadas à célula. CATANI (1999), utilizou polimixina B em diferentes concentrações e tempos de cultura, para extrair enterohemolisina de amostras de *E. coli*, e não obteve resultados positivos.

Os resultados observados com sobrenadantes de culturas realizadas em BHI e BHI suplementado, adicionados da dose subinibitória do antibiótico, apresentaram títulos que variaram de 1/4 a 1/8 com amostras ESBL (+) e entre 1/2 a 1/4 com as mesmas amostras cultivadas na ausência do antibiótico em células Vero, revelando que a presença do antibiótico provocou discreto aumento na produção da citotoxina. As amostras ESBL (-) apresentaram título de 1/2 em células Vero. Em células HeLa e HT-29 os títulos obtidos foram de 1/8 com amostras ESBL (+) cultivadas na presença do antibiótico, e de 1/4 para amostras ESBL (+) cultivadas na ausência do antibiótico; mostrando maior sensibilidade destas células à ação da citotoxina que das células Vero. As amostras ESBL (-) apresentaram títulos de 1/2 com estas células, como observado com as células Vero. SINGH *et al.* (2000), observaram que células MDBK eram mais sensíveis à ação das citotoxinas de *K pneumoniae* que células Vero.

Estudos sobre a influência de doses subinibitórias de drogas antimicrobianas sobre a virulência de bactérias tem aumentado nos últimos anos (GRIF *et al.*, 1998; KIMMIT *et al.*, 1999; KIMMIT *et al.*, 2000). GRIF *et al.* (1998) observaram que doses subinibitórias de cefixime, ceftriaxona ou eritromicina aumentavam a expressão de verotoxinas por amostras de *E.coli* enterohemorrágica O157 que causa diarreia, colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica (HUS) em humanos. Estes pesquisadores levantaram a hipótese de que o aumento na expressão das toxinas estaria na indução dos fagos que carreavam os genes para síntese destas toxinas, ou que o estímulo na produção de toxinas provocada pelo antibiótico poderia causar mudanças quantitativas e qualitativas na composição da membrana externa dessas bactérias e que, alterações estruturais na membrana externa podem causar aumento da permeabilidade e assim estimular a secreção de toxinas por interferir no controle da síntese.

Existem vários fatores protetores contra invasão de microrganismos no sistema circulatório do hospedeiro, entre estes estão a fagocitose realizada por polimorfonucleares e a ação do sistema complemento. Microrganismos patogênicos desenvolvem estratégias para burlar a ação bactericida do soro. Muitas bactérias Gram-negativas comensais são sensíveis ao efeito bactericida do soro humano, enquanto linhagens patogênicas freqüentemente exibem propriedades de resistência ao soro (OLLING, 1977, *apud* POUDSCHUN & ULLMANN, 1998). Enterobactérias isolados de casos clínicos freqüentemente mostram resistência ao soro; a capacidade de resistir ao soro tem sido correlacionada com o tipo de infecção e a severidade dos sintomas. Diferenças no grau de suscetibilidade a ação bactericida do soro pode determinar se a linhagem é hábil para infectar e o tempo que esta leva para provocar a infecção (POUDSCHUN & ULLMANN, 1998).

Os resultados observados neste trabalho mostraram que, entre as amostras ESBL (+), 60% foram considerados resistentes a ação bactericida do soro humano, enquanto entre as ESBL (-) apenas uma amostra foi resistente. O cultivo na presença da dose subinibitória não aumentou a resistência à atividade bactericida do soro.

Segundo PLUSCHKE *et al.* (1983), a base molecular da resistência ao complemento não era bem entendida, mas provavelmente era multifatorial; inicialmente polissacarídeos da cápsula e antígenos somáticos O foram implicados.

No caso de *Klebsiella* dois mecanismos foram levantados (MERINO *et al.*, 1992): o primeiro seria uma parcial ou completa incapacidade de ativar o sistema complemento, característica de linhagens em que os polissacarídeos capsulares mascaram o LPS evitando a ativação, porque expõem substâncias inativadoras como o ácido siálico; o segundo mecanismo, típico de linhagens onde os polissacarídeos

capsulares e o LPS são expostos juntos na superfície celular, ocorre a ativação dos componentes do complemento que se ligam ao longo da cadeia do LPS, em locais longe da membrana celular impedindo a lise. A quantidade da proteína C3b depositada no LPS também determina o grau da resistência ao soro (ALBERTÍ *et al.*, 1996). Linhagens sensíveis ao soro ativam as duas vias do sistema complemento, alternativa e clássica, enquanto linhagens resistentes ao soro ativam apenas a via alternativa. A ativação das duas vias leva a uma maior deposição de C3b, resultando em maior grau de destruição e morte bacteriana.

Segundo POUDSCHUN & ULLMANN (1998) a resistência ao soro não seria uma característica estável, podendo ser afetada por fatores ambientais e pela composição e efeito do LPS, pois dentro do mesmo sorotipo podem ser encontradas amostras resistentes e sensíveis. Existem estudos mostrando a influência de diferentes condições de osmolaridade sobre o LPS de bactérias. Quando estas eram cultivadas em condições de alta osmolaridade apresentavam resistência ao soro humano normal, enquanto bactérias crescidas em condições de baixa osmolaridade mostravam sensibilidade ao mesmo (AGUILAR *et al.*, 1997; *apud* POUDSCHUN & ULLMANN, 1998).

CARBONELL (1992), analisando a resistência ao soro de amostras de *Serratia marcescens*, encontrou amostras sensíveis e resistentes pertencentes ao mesmo sorotipo. Os resultados encontrados neste estudo foram concordantes com os dados da literatura, pois mostraram que a resistência ao soro humano normal variou entre as amostras ESBL (+) e ESBL (-). A presença da dose subinibitória não alterou esta característica nas amostras ESBL (+).

A habilidade para obter ferro durante o crescimento “*in vivo*” é um importante determinante de virulência em muitas espécies bacterianas. Como o ferro não está livre e disponível nos tecidos e fluidos, muitos microrganismos produzem substâncias quelantes do ferro de baixo peso molecular e alta afinidade, denominadas de sideróforos (WARNER & WILLIAMS, 1981; HIDER, 1984; *apud*, BROCK *et al.*, 1991).

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que todas as amostras ESBL (+) e ESBL (-) tanto de *K.pneumoniae* como de *E.coli* foram produtoras de aerobactina, revelando a capacidade destas amostras de retirarem ferro das proteínas carreadoras ou das células.

Segundo MARTINEZ *et al.* (1987), citado por PODSCHUN & ULLMANN (1998), as enterobactérias podem ser divididas em dois grupos de acordo com a síntese de aerobactina, um grupo com baixa porcentagem de linhagens produtoras de aerobactina compreendendo gêneros como *Serratia*, *Proteus* e *Salmonella*; o segundo grupo com alta incidência de síntese de aerobactina inclui o gênero *Escherichia*. No gênero *Klebsiella*, tem sido demonstrada a presença de enterobactina e aerobactina. Entretanto, enquanto todas as linhagens produzem enterobactina, a aerobactina tem sido observada apenas em algumas, independente da espécie e do local do isolamento (PODSCHUN *et al.*, 1992; *apud* PODSCHUN & ULLMANN, 1998). BROCK *et al.* (1991), demonstraram que os dois sideróforos podem adquirir ferro de diferentes fontes; enterocolina predominantemente retira o ferro da transferrina e a aerobactina obtém ferro preferencialmente das células ou tecidos. Amostras de *E.coli* invasoras foram correlacionadas com a produção de aerobactina, uma vez que ficam em contato com os tecidos que são uma fonte potencial de ferro (BROCK *et al.*, 1991). A produção de aerobactina foi comprovada estar associada com linhagens virulentas de *Klebsiella*

(NASSIF & SANSONETTI, 1986). Foi demonstrado que isolados de *K.pneumoniae* que não sintetizam aerobactina, eram capazes de usar aerobactina exógena como sua única fonte de ferro, porque expressavam o receptor para aerobactina; estas linhagens poderiam levar vantagem sobre bactérias sintetizadoras de aerobactina em infecções mistas (WILLIAMS & TOMAS, 1990).

A capacidade de aderir às células intestinais tem sido bastante estudada em enterobactérias patogênicas. Investigações epidemiológicas têm revelado que o reservatório de linhagens de *K.pneumoniae* e de outras enterobactérias que causam infecções nosocomiais era o trato gastrointestinal do paciente, portanto foi suposto que as linhagens eram hábeis a aderir ao epitélio intestinal. (DARFEUILLE-MICHAUD *et al.*, 1992; FAVRE-BONTE *et al.*, 1995). Tem sido demonstrado que a colonização das superfícies mucosas do hospedeiro por patógenos entéricos requer fatores especializados codificados pelo microrganismo que ligam especificamente as células do hospedeiro (DONNENBERG & KAPER, 1992; *apud* FAVRE-BONTE *et al.*, 1995; DI-MARTINO *et al.*, 1996), sugerindo que fímbrias, adesinas não fimbriais e polissacarídeos extra-capsulares estariam envolvidos no processo de adesão (DARFEUILLE-MICHAUD *et al.*, 1992; HORNICK *et al.*, 1992; FAVRE-BONTE *et al.*, 1995). Segundo LIVRELLI *et al.* (1996), muitos gêneros da família *Enterobacteriaceae* expressam fímbrias do tipo 1 que causam aglutinação manose - sensível de eritrócitos de cobaias e fímbrias do tipo 3 que medeiam aglutinação manose-resistente semelhante à aglutinação de eritrócitos tratados com ácido tânico por linhagens de *Klebsiella*.

Linhagens de *E.coli* isoladas de fezes diarréicas têm sido classificadas em diferentes grupos de acordo com o padrão de aderência que apresentam em cultura de

células: aderência localizada, aderência agregativa e aderência difusa (FAVRE-BONTE, *et al.*1995). Estes padrões de adesão estão associados com diferentes síndromes clínicas e com o padrão de resistência as drogas antimicrobianas (BALDINI, *et al.*,1983; VIAL *et al.*,1988; GIRON *et al.*,1991, *apud* FAVRE-BONTE *et al.*,1995; LIVRELLI *et al.*, 1996).

Esse mesmo padrão de adesão foi observado com linhagens de *K. pneumoniae* isoladas de infecções nosocomiais (LIVRELLI *et al.*, 1996). Foi demonstrada a transferência de genes que codificam fatores de adesão entre amostras de *E.coli* e *K. pneumoniae* no intestino humano, uma vez que a adesina CF29K idêntica à proteína CS31A-L carregada por linhagens de *E.coli* promovem a habilidade de amostras de *E.coli* e *K.pneumoniae* ligarem em linhagens de células intestinais como CaCo-2.

Neste estudo, foram observados os três padrões de adesão descritos anteriormente, com as amostras ESBL (+) e ESBL (-). O padrão agregativo prevaleceu sobre os demais nas amostras ESBL (+) e estava presente em duas amostras ESBL (-) uma de *E.coli* e outra de *K.pneumoniae*. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por LIVRELLI *et al.* (1996), que observaram a predominância deste fenótipo em amostras de *K.pneumoniae* isoladas de infecções nosocomiais. Por outro lado, estes pesquisadores observaram uma maior relação entre o padrão de adesão localizada entre amostras multiresistentes de *K. pneumoniae*, produtoras das  $\beta$ -lactamases CAZ-5/SHV-4, do que em amostras sensíveis. Estes resultados foram divergentes dos encontrados neste estudo, pois encontramos apenas uma amostra entre as ESBL (+) com aderência localizada. Pode ser que os tipos de adesinas e receptores celulares envolvidos neste processo, assim como as condições de cultivo tenham determinado estas diferenças.

O resultado do teste de letalidade em animais comprovou a patogenicidade das amostras utilizadas, entretanto não foram observadas diferenças no grau de virulência entre as amostras ESBL (+) e ESBL (-) neste experimento, pois a porcentagem de morte variou de 60 a 80 % no período de 12 a 24 horas, respectivamente. Comparando estes resultados com os testes de produção de hemolisina verificamos que outros fatores de virulência poderiam ser os responsáveis pela patogenicidade das amostras. Segundo YI-CHYI LAI, *et al.* (2000), as populações de *K.pneumoniae* patogênicas são altamente heterogêneas, podendo expressar genes que codificam polissacarídeos capsulares que não são essenciais para o crescimento de *K. pneumoniae in vitro*, mas *in vivo* têm sido mostrados como um dos principais fatores de virulência de *K. pneumoniae*, funcionando como uma barreira contra a fagocitose de polimorfonucleares no hospedeiro. SINGH *et al.* (2001), descreveram recentemente que citotoxinas têm sido um dos principais fatores de virulência de amostras de *Klebsiella* responsáveis pela letalidade de animais. Em nossos estudos não foram observadas diferenças na expressão de citotoxinas nem na produção de aerobactina entre as amostras ESBL (+) e ESBL (-) estudadas. Também não foram observadas diferenças na análise histológica dos órgãos retirados dos animais infectados com as respectivas amostras, confirmando a semelhança no grau de virulência das amostras nas condições testadas.

## 7. CONCLUSÕES

1 – A presença da dose subinibitória do antibiótico não influenciou de forma significativa a produção de fatores de virulência como hemolisinas, citotoxinas, resistência a atividade bactericida do soro e produção de aerobactina pelas amostras ESBL (+), nas diferentes condições estudadas.

2 – Amostras ESBL (+) apresentaram atividade hemolítica para hemácias eqüinas, quando cultivadas em meios carentes de ferro independente da tensão de oxigênio.

3 – Amostras ESBL (-) apresentaram atividade hemolítica para hemácias eqüinas apenas quando cultivadas em meios carentes de ferro e em aerobiose.

4 – A ausência de ferro em placas de ágar-sangue (carneiro) favoreceu a atividade hemolítica de 07 amostras de *K. pneumoniae* ESBL (+) apenas em anaerobiose. Estes resultados indicam que estas amostras possivelmente produziam mais que um tipo de hemolisina, já que uma lisava hemácias eqüinas, independente da tensão de oxigênio; e outra rompia hemácias de carneiro apenas em anaerobiose.

5 – Condições de estresse como: carência de ferro e presença de antibióticos, associadas com baixa tensão de oxigênio em placas de ágar-sangue foram as melhores condições encontradas para a produção e expressão de hemolisina(s) pelas amostras em estudo.

6 – A presença de cálcio nos meios teve ação semelhante à da dose subinibitória do antibiótico, para amostras ESBL (+) sobre hemácias eqüinas, em placas.

8 – Hemácias eqüinas foram mais sensíveis à ação da(s) hemolisina(s), que as outras hemácias testadas.

9 – Apenas as amostras de *E.coli* ESBL (+) e (-) apresentaram atividade hemolítica nos sobrenadantes das culturas, nas diferentes condições estudadas, para hemácias eqüinas e de carneiro.

10 – A combinação de cultivo em meio carente de ferro associada com a diluição das hemácias em PBS adicionado de cálcio favoreceu a expressão de atividade hemolítica nos sobrenadantes de 03 amostras ESBL (+) de *K.pneumoniae* para hemácias eqüinas.

11 – Sobrenadantes das amostras ESBL (-) apresentaram mesmo tipo de efeito citopático que as amostras ESBL (+), nas culturas de células, porém com títulos mais baixos.

12 – Células HT-29 apresentaram maior sensibilidade a ação das citotoxinas das amostras em estudo.

13 – A maioria das amostras ESBL (-) foi sensível à ação bactericida do soro.

14 – Observou-se três tipos de adesão em células HeLa e HT-29, adesão agregativa, a localizada e difusa, entre as amostras de *K. pneumoniae* e *E.coli* ESBL (+), sendo o tipo agregativo predominante. Estes resultados corroboram com dados da literatura que relacionam este tipo de adesão com infecções nosocomiais.

15 – As amostras em estudo não eram produtoras da enterotoxina termo estável.

16 – Não houve diferença na virulência das amostras ESBL (+) e ESBL (-) de *K. pneumoniae* no ensaio *in vivo*. A amostra de *E.coli* ESBL (+) foi menos virulenta que a amostra ESBL (-).

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ALBERTI, S.; ALVAREZ, D.; MERINO, S.; CASANO, M.T.; VIVANCO, F.; TOMAS, J. M. and BENEDI, V.J. Analysis of complement C3 deposition and degradation on *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**: 4726 - 32, 1996.

ALBESA, I; BARBERIS, L, I; PAGARO, M. C; FARNOCHI, M. C; ERASO, A. J. A thiol-activated hemolysin in Gram-negative bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **31**: 297 - 300, 1985.

ALBESA, I. *Klebsiella pneumoniae* haemolysin adsorption to red blood cells. *J. Appl. Bacteriol.*, **67**: 263 - 66, 1989.

AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamases, philos. *Trans. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **289**: 321 - 31, 1980.

AMBLER R. P; COULSON, A. F; FRERE, J. M. A standard numbering scheme for the class A  $\beta$ -lactamases, *Biochem. J.*, **276**: 269 - 70, 1991.

ATHAMA, A; OFEK, I; KEISARI, Y; MARKOWITZ, S; SHARON, N. Lectinophagocytosis of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* mediated by surface lectins of guinea pig alveolar macrophages and human monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.*, **59**: 1673 - 82, 1991.

AYLING-SMITH, B & PITT, T. L. State of the art in typing: *Klebsiella* spp. *J. Hosp. Infect.*, **16**: 287 - 295, 1990.

BARATELA, K. C; SARIDAKIS, H. O; GAZIRI, L. C. J; PELAYO, J. S. Effects of medium composition, calcium, iron and oxygen on haemolysin production by *Plesiomonas shigelloides* isolated from water. *J. Appl. Bacteriol.* **90**: 482 - 87, 2001.

BARBERIS, L. I; ERASO, A. J; PAJARO, M. C; ALBESA, I. Molecular weight determination and partial characterization of *Klebsiella pneumoniae* hemolysins. *Can. J. Microbiol.*, **32**: 884 - 88, 1986.

BRADFORD, P. A; URBAN, C; MARIANO, N; PROJAN, S. J; RAHAL, J. J; BUSH, K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated Amp-C  $\beta$ -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents. Chemothe.*, **41**: 563 - 69, 1997.

BEUTIN, L.; PRADA, J.; ZIMMERMANN,S.; STEPHAN,R.; ORSKOV, I. and ORSKOV, F. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Zentralbl. Bakteriolog. Hyg. Abt. [A]* **267**: 576 - 88, 1988.

BHAKDI, S.; MACKMAN, N.; NICAUD, J.M. and HOLLAND, I. B. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generation transmembrane pores. *Infect.Immun.* **52**: 53 – 9, 1986.

BLANCO, J.; BLANCO, M.; GONZALEZ, E. A.; ALONSO, M. P. and GARABAL, J. I. Comparative evaluation of three test for the detection of *Escherichia coli* cytotoxin necrotizing factors ( CNF1 and CNF2) using filtrates of cultures treated with mitomycin C. *FEMS Microbiol. Lett.* **69**: 311 – 16, 1990.

BRADFORD, P. A. Extended – spectrum beta – lactamases in the 21<sup>st</sup> characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin. Microb. Rev.*, **14(4)**: 933 - 51, 2001.

BUSH, K. Characterization of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 259 - 63, 1989.

\_\_\_\_\_. New beta – lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**: 1085 – 89, 2001.

BUSH, K; JACOBY, G. A; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **39** (6): 1211 - 33, 1995.

CARBONELL, G.V. **Serratia marcescens de origem hospitalar, resistência a drogas antimicrobianas e fatores de virulência.** 1992, 88 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

CARBONETTI, N. H.; BOONCHA, S.; PARRY, S.H.; VAISANEN – RHEN,V.; KORHONEN, T. K.; WILLIAMS, P. H. Aerobactin – mediated iron uptake by *Escherichia coli* isolates from human extraintestinal infections. *Infect.Immun.* **51** (3): 966 – 68,1986.

CATANI, C. F. **Purificação e caracterização de enterohemolisina produzida por *Escherichia coli* enteropatogênicas.** 1999, 83 p. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular – Bioquímica) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas / SP.

CAVASSIN, E., D. **Controvérsias sobre Beta- Lactamases AmpC e ESBL.** 2002, 89 p. Monografia (Especialização em Análises Clínicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PN.

CHART, H; JENKINS, C; SMITH, H. R; HEDGES, D; ROWE, B. Haemolysin production by strains of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiology*, **114**: 103 - 07,1998.

CLEGG, S & GERLACH, G. F. Enterobacterial fimbriae. *J. Bacteria.*, **169**: 934 - 38, 1987.

CRYZ, S. J; FÜRER, E; GERMANIER, R. Experimental *Klebsiella pneumoniae* burn wound sepsis: role of capsular polysaccharide. *Infect. Immun*, **43**: 440 - 41, 1984.

DARFEUILLE-MICHAUD, A; JALLAT, C; AUBEL, D; SIROT, D; RICH, C; SIROT, J; JOLY, B. R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections. *Infection. Immun.*, **60** (1): 44 - 55, 1992.

DEAN, A. G.; CHING, Y.; WILLIAMS, R. G.; HARDEN, L. B. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice. Application in a study of diarrhoea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, **125**: 407 - 11,1972.

DE LORENZO, V & MARTINEZ, J. L. Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7**: 621 - 29, 1988.

DI MARTINO, P., Y. BERTIN, J. P. GIRARDEAU, V. LIVRELLI, B. JOLY, and DARFEUILLE-MICHAUD, A. Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect. Immun.* **63**: 4336 – 44, 1995

DI MARTINO, P; LIVRELLI, V; SIROT, D; JOLY, BERNARD; DARFEUILLE-MICHAUD, A. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect. Immun.*, **64** (6): 266 - 73, 1996.

DUGGAN, J. M; OLDFIELD, G. S; GHOSH, H. K. Septicaemia as a hospital hazard. *J. Hosp. Infect*, **6**: 406 - 12, 1985.

EDMONDSON, A. S; COOKE, E. M; WILCOCK, A. P. D; SHINEBAUM, R. A comparison of the properties of *Klebsiella* strains isolated from different sources. *J. Med. Microbiol*, **13**: 541 - 550, 1980.

FAVRE-BONTE, S; DARFEUILLE-MICHAUD, A; FORESTIER, C. Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human intestine-407 cells. *Infect. Immun.*, **63** (4): 1318 - 28, 1995.

GERLACH, G. F; ALLEN, B. L; CLEGG, S. Type 3 fimbriae among enterobacterias and the ability of spermidine to inhibit MR/K hemagglutination. *Infect. Immun*, **57**: 219 - 24, 1989.

GRIF, K; DIERICH, M. P; KARCH, H; ALLERBERGER, F. Strain-specific differences in the amount of sigma toxin released from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **17**: 761-766, 1998.

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

HORNICK, D. B; ALLEN, B. L; HORN, M. A; CLEGG, S. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. *Infect Immun.*, **60** (4): 1577-88, 1992.

JACOBY, G. A. Genetics of extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **13** (suppl 1): S2-S11, 1994.

\_\_\_\_\_. Desenvolvimento da resistência em patógenos Gram-negativos:  $\beta$ -lactamases de amplo espectro, *Relatório Especial Hospital Practice*, jul: 14 - 21, 2000.

JOINER, K. A. Complement evasion by bacteria and parasites. *Annu. Rev. Microbiol.*, **42**: 201 - 230, 1988.

KARAS, J. A; PILLAY, D. G; MUCKART, D; STURM, A. W. Treatment failure due to extended spectrum beta-lactamase. *J.Anti.Chem.*, **37**: 203 - 4, 1996.

KARMALI, M. A.; PETRIC, M.; LIM, C.; CHEUNG, R. and ARBUS, G. S. Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin – producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use colony sweeps and polymycin extraction of verotoxin. *J.Clin. Microbiol.* **22**: 614 – 9, 1985.

KIMMITT, P. T; HARWOOD, C. R; BARER, M. R. Induction of type 2 Shiga toxin Synthesis in *Escherichia coli* O157 by 4-quinolones, *The Lancet*, **353**: 1588 - 89, 1999.

KIMMITT, P. T; HARWOOD, C. R; BARER, M. R. Toxin gene expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial sos response. *Emerg.Infect. Diseases*, **6** (5): 458 - 64, 2000.

KLIPSTEIN, F. A., ENGERT, R. F. and HOUGHTEN, R. A. Immunological properties of purified *Klebsiella pneumoniae* heat- stable enterotoxin. *Infect. Immun.*, **42**: 838 – 41, 1983.

KONEMAN, W.E.; ALLEN, D.S.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, W.C. Jr. Prova para determinar atividade inibitória dos antibióticos. p. 815 – 856. In: **Diagnóstico Microbiológico**. ( Editora Medsi), 5ª ed. Rio de Janeiro, 2001.

LAI, Y; YANG, S; PENG, H; CHANG, H. Identification of genes present specifically in a virulent strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.*, **68** (12): 7149 - 51, 2000.

LIVERMORE, D.M.  $\beta$ -lactamases-mediated resistance and opportunities for control. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**: 25 - 41, 1998.

LIVRELLI, V; DE CHAMPS, C; DI MARTINO, DARFEUILLE-MICHAUD, A; FORESTIER, C; JOLY, B. Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections. *J.Clin. Microb.*, **34** (8): 1963 - 69, 1996.

MEDEIROS, A. A. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* **24**:19 - 45, 1997.

MERINO, S.; CAMPRUBI, S.; ALBERTI, S.; BENEDI, V.J. and TOMAS, J.M. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement – mediated killing. *Infect. Immun.*, **60** (6): 2529 - 35, 1992.

MIZUTA, K; OHTA, M; MORI, M; HASEGAWA, T; NAKASHIMA, I; KATO, N. Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsule (K) types. *Infect. Immun.*, **40**: 56 - 61, 1983.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S. & PFALLOR, M. A. *Enterobacteriaceae* p.193 – 197. In: *Microbiologia Medica*. (Editora Guanabara Koogan), 3a ed. Rio de Janeiro, 2002, 604p.

NASSIF, X; SANSONETTI, P. J. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactina. *Infect. Immun.*, **54** (3): 603 - 608, 1986.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twelfth informational supplement. M100-S12*. NCCLS, Villanova, PA, 2002.

OFEK, I; KABHA, K; ATHAMA A; FRANKEL, G; WOZNIAK, D. J; HASTY, D. L; OHMAN, D. E. Genetic exchange of determinants for capsular polysaccharide biosynthesis between *Klebsiella pneumoniae* strains expressing serotypes K2 and K21a. *Infect. Immun.*, **61**: 4208 -16, 1993.

OFEK, I & DOYLE, R. J. Bacterial adhesion to cells and tissues. *Chapman & May, Ltd*, London, U.K., 1994.

OLD, D. C & ADEGBLA, R. A. Antigenic relationships among type-3 fimbriae of *Enterobacteriaceae* revealed by immunoelectronmicroscopy. *J. Med. Microbiol.* **20**: 113 - 21, 1985.

PARREIRA, V. R. **Síndrome da cabeça inchada (SCI) em galinhas, detecção sorológica do vírus da rinotraqueite de perus (TRTV) e caracterização dos fatores de resistencia de *Escherichia coli***. 1994, 128 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.

PATTERSON, J. E; RECH, M; JORGENSEN, J. H. Extended-spectrum beta-lactamases: dilemmas in detection and therapy. *Antimicrob. Infect. dis. news.*, **16** (8), 1997.

PATTERSON, J. E.  $\beta$  – lactamases de amplo espectro. In: **Relatório Especialde Hospital Practice “Patógenos Emergentes nas Doenças Infeciosas”**. (Eroumedice - Edições Médicas) jul., 2000.

PELKONEN, S. and FINNE, J. A rapid turbidimetric assay for the study of serum sensitivity of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **42**: 55 – 57, 1987.

PITTET, D; LI, N; WENZEL, R. P. Association of secondary and polymicrobial nosocomial bloodstream infections with higher mortality. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, **12** 813 - 19, 1993.

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

PLUSCHKE, G; MAYDEN, J; ACHTMAN, M; LEVINE, R. P. Role of the capsule and the antigen in resistance of O18:K1 *Escherichia coli* to complement-mediated killing, *Infect. Immun.*, **42**: 907-13, 1983.

RAMM, L. E; WHITLOW, M. B; MAYER, M. M. Size distribution and stability of the trans-membrane channels formed by complement complex C5b-9. *Mol. Immun.*, **20**: 155-60, 1983.

REISH, O; ASHKENAZI, S; NAOR, N; SAMRA, Z; MORLOB, P. An outbreak of multiresistant *Klebsiella* in a neonatal intensive care unit. *J. Hosp. Infect*, **25**: 287-91, 1993.

RICE, L. B; CARIAS, L. L; HUJER, A. M; BONAFEDE, M; HUTTON, M; HOYEN, C. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 beta-lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*, *Antimicrob. Ag. Chem.*, **44**: 362 -7, 2000.

SANDERS, C. C. Cefepime: the next generation. *Clin. Infect. Dis.*, **17**: 369 - 79, 1993.

SIMOONS-SMIT, A. M; VERWEIJ-VAN VUGHT, A. M. J. J; MACLAREN, D. M. Virulence of *Klebsiella* strains in experimentally induced skin lesions in the mouse. *J. Med. Microbiol*, **17**: 67 - 77, 1984.

SINGH, B. R; SHARMA, V. D; CHANDRA, R. Purification and characterization of *Klebsiella pneumoniae* cytotoxins. *Indian J. Experim. Biol.*, **37**: 681 - 690, 1999.

SINGH, B. R; SHARMA, V. D; CHANDRA, R. A study on virulence markers of *Klebsiella* isolated from foods and clinical samples. *J. Food Sci. Technol*, **37** (4): 348 - 56, 2000.

SINGH, B. R. and SHARMA, V.D. Potential of *Klebsiella pneumoniae* cytotoxin toxoid as vaccine against klebsiellosis in rabbits and mice. *Vaccine*. **19**: 4505 – 4510, 2001.

SIU, L. K; LU, P. L; HSUEH, P. R; LIN, F. M; CHANG, S. C; LUH, K. T. Bacteremia due to extended-spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric oncology ward: clinical features and identification of different plasmids carrying both SHV-5 and TEM-1 genes, *J. Clin. Microbiol.*, **37**: 4020 - 7, 1999.

TARKKANEN, A. M; VIRKOLA, R; CLEGG, S; KORHONEN, T. K. Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. *Infect. Immun*, **54**: 1546 - 49, 1997.

TAYLOR, P. W & KROLL, H. P. Effect of lethal doses of complement on the functional integrity of target enterobacterias. *Curr. Top. Microbiol. Immun.*, **121**: 135-58, 1985.

THOMSON, K. S. & MOLAND, E. S. Version 2000: the new beta-lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microb. Infect.*, **2**:1225 -35, 2000.

TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L. R.. EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H<sub>2</sub>S, urease e triptofanodesaminase. *Rev. Microbiol.*, **13**: 309 – 15, 1982a.

TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L. R.. Mlli: um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina – descarboxilase. *Rev. Microbiol.*, **13**: 230 – 35, 1982b.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. *Escherichia coli* p 215 – 28. In: *Microbiologia* (Editora Atheneu), 3<sup>a</sup>. ed. São Paulo, 1999, 586p.

VENEGAS, M. F.; NAVAS, E. L.; GAFFNEY, R. A.; DUNCAN, J. L.; ANDERSON, B. E.; SCHAEFFER, A. J. Binding of type 1-piliated *Escherichia coli* to vaginal mus. *Infect. Immun*, **63**: 416 - 422, 1995.

WIENER, J.; QUINN, J.P.; BRADFORD, P.A.; GOERING, R.V.; NATHAN, C.; BUSH, K. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *J. of the Am. Med. Assoc.*, **281**: 517 - 23, 1999.

WILLIAMS, P.; LAMBERT, P. A.; BROWN, M. R. W.; JONES, R. J. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J. Gen. Microbiol*, **129**: 2181 - 91, 1983.

WILLIAMS, P & TOMAS, J. M. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. *Rev. Med. Microbiol.*, **1**: 196 - 204, 1990.

YINNON, A. M.; BUTNARU, A.; RAVEH, D.; JERASSY, Z.; RUDENSKY B. *Klebsiella* bacteremia: community versus nosocomial infection. *Montly J. Assoc. Physicians*, **89**: 933 - 41, 1996.

YOH, M.; FRIMPONG, E. K.; HONDA, T. Effect of antimicrobial agents, especially fosfomicin, on the production and release of Vero toxin by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Immun.Medic. Microbiol.*, **19** (1): 57- 64, 1997.

ZEMELMAN, C; BELLO, H; DOMINGUES, M; GONZALEZ; MELLA, S; ZEMELMAN, R. Activity of cefepime, cefotaxime, ceftazidime, and aztreonam against extended-spectrum-producing isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from Chilean hospitals. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, **40**: 41 - 43, 2001.