

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

**Investigação de grupos filogenéticos entre isolados hospitalares e comunitários de
Klebsiella pneumoniae provenientes de Recife-PE: relação com resistência a
antimicrobianos e origem de isolamento.**

Maíra Espíndola Silva de Melo

Recife-PE

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Maíra Espíndola Silva de Melo

**Investigação de grupos filogenéticos entre isolados hospitalares e comunitários de
Klebsiella pneumoniae provenientes de Recife-PE: relação com resistência a
antimicrobianos e origem de isolamento.**

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre em Medicina Tropical.

Orientadores:

Prof^a Dr^a Maria Amélia Vieira Maciel

Prof^a Dr^a Ana Catarina de Souza Lopes

Recife-PE

2009

Melo, Máira Espíndola Silva de
Investigação de grupos filogenéticos entre
isolados hospitalares e comunitários de *Klebsiella
pneumoniae* provenientes de Recife- PE: relação com
resistência a antimicrobianos e origem de isolamento
/ Máira Espíndola Silva de Melo. – Recife : O Autor,
2009.

82 folhas : fig. e tab.

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

Inclui bibliografia e anexos.

1. Doenças infecciosas bacterianas. 2.
Klebsiella pneumoniae. 3. Grupos filogenéticos. 4.
Resistência a antimicrobianos. I.Título.

616-022.7
616.92

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

UFPE
CCS2009-071



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

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

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

MAÍRA ESPÍNDOLA DA SILVA

No dia 09 de março do ano de 2009, às 15h00, na Sala de Reunião do PPGMEDTROP do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), os Membros Doutores: Prof^ª. Dr^ª. **Célia Maria Machado Barbosa de Castro (UFPE/Membro Interno)**, a Prof^ª. Dr^ª. **Janete Magali de Araújo (UFPE/Membro Externo)** e a Prof^ª. Dr^ª. **Nilma Cintra Leal (CPqAM-FIOCRUZ/Membro Externo)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a mestranda **MAÍRA ESPÍNDOLA DA SILVA** sobre a sua dissertação intitulada **“INVESTIGAÇÃO DE GRUPOS FILOGENÉTICOS ENTRE ISOLADOS HOSPITALARES E COMUNITÁRIO DE *Klebsiella pneumoniae* PROVENIENTES DE RECIFE-PE: RELAÇÃO COM RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E ORIGEM DE ISOLAMENTO”**. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof^ª. Dr^ª. **Célia Maria Machado Barbosa de Castro**

Aprovada

Prof^ª. Dr^ª. **Janete Magali de Araújo**

APROVADA

Prof^ª. Dr^ª. **Nilma Cintra Leal**

APROVADA

Célia Maria Machado B. de Castro

Prof^ª. Dr^ª. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Janete Magali de Araújo

Prof^ª. Dr^ª. Janete Magali de Araújo

Nilma Cintra Leal

Prof^ª. Dr^ª. Nilma Cintra Leal

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

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

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. José Tadeu Pinheiro

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

Profª. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

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

Profª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

CORPO DOCENTE

Profª. Célia Maria Machado Barbosa de castro

Profº. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Profª. Elizabeth Malagueño de Santana

Profª. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Profª. Maria Amélia Vieira Maciel

Profª. Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Profª. Maria do Amparo Andrade

Profª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Profº. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Profª. Sylvia Maria de Lemos Hinrinchen

Profª. Valdênia Maria Oliveira de Souza

Profª. Vera Magalhães da Silveira

DEDICO

*Ao meu marido Albérico por estar
sempre presente e me incentivar
em todas as etapas que preciso
conquistar;*

A meus pais pelo apoio e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar sempre meus caminhos, permitir que meus objetivos se concretizem e me proteger sempre em todas as situações;

Ao meu marido Albérico, por tudo o que representa e pela força que tem me dado sempre;

Aos meus pais, Marluce e Mauro, pelo carinho, amor e educação que muito contribuíram na minha formação. Aos meus irmãos e toda a minha família, pelo amor e por sempre me apoiarem em tudo o que decidi realizar na minha vida;

Às minhas orientadoras, Prof^a Dr^a Ana Catarina de Souza Lopes e Prof^a Dr^a Maria Amélia Vieira Maciel, por todos os ensinamentos transmitidos, pela orientação, confiança, profissionalismo e amizade durante a realização desse trabalho;

Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE), pela facilidade no uso das instalações dessa instituição;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pelo empenho na condução do Curso, e aos funcionários Walter e Jupira pelo apoio prestado;

À Adriane Borges Cabral e Rita de Cássia, alunas de iniciação científica do Setor de Biologia Molecular do LIKA e da disciplina de Microbiologia, pela amizade, dedicação e colaboração durante a realização deste trabalho;

Aos colegas de turma do Curso de Mestrado, em especial a Narjara, Maiara, Mirelle e Luiz Felipe pela amizade, estímulo e companheirismo ao longo do Curso;

Aos colegas do setor de Biologia Molecular e a todos que fazem o LIKA, que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho;

Aos meus grandes amigos: Ana Paula, Betânia, Bethânia, Lígia, Narjara, Djalma e Lincoln pela nossa amizade em todos os momentos, e por tudo o que construímos nesses vários anos de convivência. Adoro vocês!

Ao CNPq e FACEPE, pelo suporte financeiro.

"O fator decisivo para vencer o maior obstáculo é, invariavelmente, ultrapassar o obstáculo anterior."

Henry Ford

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do gênero <i>Klebsiella</i> por diferentes sistemas taxonômicos (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).....	20
--	----

ARTIGO

Tabela 1. Principais testes bioquímicos para identificação de enterobactérias.....	52
---	----

Tabela 2. Proporção de isolados de <i>K. pneumoniae</i> sensíveis, intermediários e resistentes aos antimicrobianos testados entre os três grupos filogenéticos encontrados.....	53
---	----

Tabela 3. Correlação entre resistência a antimicrobianos de diferentes classes e produção de ESBLs por isolados de diferentes grupos filogenéticos de <i>K. pneumoniae</i>	53
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Isolamento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em ágar MacConkey.....	20
Figura 2. Testes bioquímicos convencionais para identificação de bactérias Gram-negativas e com resultado característico para <i>K. pneumoniae</i>	35
Figura 3. Placa com meio Ágar Mueller-Hinton após incubação para teste de susceptibilidade a antimicrobianos pela técnica de difusão em disco proposta por Kirby e Bauer.....	36
Figura 4. Placa com meio Ágar Mueller-Hinton após incubação para teste de detecção de ESBLs pelo teste de sinergia do disco duplo proposta por Vercauteren <i>et al.</i> (1997).....	37
ARTIGO	
Figura 1. Exemplos de perfis de restrição obtidos após digestão do produto de PCR do gene <i>gyrA</i> de 441 pb com as enzimas <i>TaqI</i> e <i>HaeIII</i> . Os códigos dos perfis são indicados por uma letra acima de cada linha. M: Marcador de 100 pb (Amresco). O perfil <i>HaeIII</i> -B consiste em fragmentos de 175 pb, 174 pb e 92 pb, o perfil <i>HaeIII</i> -C em fragmentos de 175 pb, 129 pb, 92 pb e 45 pb e o Perfil <i>HaeIII</i> -D em fragmentos de 267 pb, 129 pb e 45 pb. O perfil <i>TaqI</i> -B apresenta fragmentos de 197 pb, 142 pb, 93 pb e 9 pb e o perfil <i>TaqI</i> -E fragmentos de 197 pb, 151 pb e 93 pb.....	54
Figura 2. Distribuição dos diferentes grupos filogenéticos de <i>K. pneumoniae</i> de acordo com a origem e ano de isolamento.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Micrograma
μl	Microlitro
BHI	Caldo infuso de cérebro e coração (Brain Heart Infusion)
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EMB	Agar Eosina Azul de Metileno (Eosin Metilen Blue)
ESBL	Extended-Spectrum β -lactamase
mA	Miliampere
mg/ml	Miligramas por mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
pb	Par de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
pmol	Picomol
RAPD	Análise de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente
RFLP	Análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIM	Meio H_2S , Indol, Motilidade
STE	Tampão SDS-Tris-EDTA
TBE	Tris-borato, ácido bórico, EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
TSI	Ágar Três Açúcares e Ferro (Triple Sugar Iron)
UV	Ultravioleta
V	Volts

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi verificar se isolados de *K. pneumoniae* provenientes de Recife-PE, Brasil, estão agrupados em diferentes grupos filogenéticos e se esses grupos estão relacionados com origem de isolamento e perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos. Portanto, foram analisados 94 isolados de *K. pneumoniae*, provenientes de infecções hospitalares e comunitárias e da microbiota normal de crianças saudáveis, pelo método de difusão de disco para detecção de susceptibilidade a agentes antimicrobianos, pelo teste de sinergia do disco duplo para detecção de ESBLs e pela fermentação do adonitol. Também foi realizada a PCR com primers específicos para amplificação do gene *gyrA* e o produto de amplificação foi digerido com as enzimas de restrição *TaqI* e *HaeIII* para identificação dos grupos filogenéticos (KpI, KpII, KpIII), como foi descrito para esta espécie em outros países. A PCR-RFLP também mostrou uma maior ocorrência do grupo KpI nos isolados hospitalares e comunitários. Por outro lado, os grupos KpII e KpIII foram encontrados principalmente em isolados da microbiota normal e em menor proporção em isolados patogênicos. A resistência às cefalosporinas de 3ª geração, aztreonam, imipenem, amoxicilina/ácido clavulânico e estreptomicina somente foi observada em isolados do grupo KpI. Os maiores percentuais de resistência foram encontrados no grupo KpI, seguido dos grupos KpII e KpIII. As diferenças na distribuição, frequência, origem e resistência dos grupos filogenéticos de *K. pneumoniae* observadas neste estudo sugerem características patogênicas e epidemiológicas distintas entre os três grupos, o que pode ser relevante para o controle de infecções causadas por *K. pneumoniae*.

Palavras-chaves: *Klebsiella pneumoniae*. Grupos filogenéticos. Resistência a antimicrobianos.

ABSTRACT

The objective of the present work was verify if the isolates of *K. pneumoniae* from Recife, Brazil, are grouped into different phylogenetic groups and if these groups are related with isolation origin and with antimicrobial resistance phenotypic profile. Therefore were analyzed 94 isolates of *K. pneumoniae*, obtained from community and hospital infections and microflora of healthy children, by the disk diffusion method for the antimicrobial susceptibility detection, by double disk synergy test for detection of ESBLs and by adonitol fermentation. PCR was also performed for amplification of the *gyrA* gene and the amplification product was digested with restriction enzymes *TaqI* and *HaeIII* for identification of phylogenetic groups (KpI, KpII, KpIII), as was described for this species in other countries. The PCR-RFLP also showed a high occurrence of KpI group, in hospital and community isolates. On the other hand, KpII and KpIII groups were found mainly in normal microbiota isolates and in less proportion in pathogenic isolates. The resistance to the third-generation cephalosporins, aztreonam, imipenem, amoxicillin/clavulanic acid and streptomycin was observed only in isolates of group KpI. The highest percentages of resistance were found in the KpI group, followed by groups KpII and KpIII. Differences in the distribution, frequency, origin and resistance of the *K. pneumoniae* phylogenetic groups observed in this study, suggest distinct pathogenic and epidemiological characteristics among the three groups, which may be relevant for the control of infections caused by *K. pneumoniae*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, phylogenetic groups, antimicrobial resistance.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 <i>Klebsiella</i>	20
2.2 Resistência bacteriana e β -lactamases	23
2.3 Tipagem molecular de isolados de <i>K. pneumoniae</i>	25
3. PERGUNTA CONDUTORA	29
4. OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo geral	32
4.2 Objetivos específicos	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1 Desenho do estudo	34
5.2 Isolados Bacterianos	34
5.3 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos	36
5.4 Pesquisa de ESBLs	36
5.5 Extração de DNA total ou genômico	37
5.6 Quantificação do DNA total	38
5.7 Condições da PCR para identificação do gene de <i>gyrA</i>	38
5.8 Purificação do produto de PCR	39
5.9 RFLP do gene <i>gyrA</i>	39
5.10 Prova de fermentação do adonitol	40
6. ARTIGO	41
ARTIGO ORIGINAL	42

Grupos filogenéticos entre isolados hospitalares e comunitários de <i>Klebsiella pneumoniae</i> provenientes do Brasil: relação com resistência a antimicrobianos e origem de isolamento.....	42
ABSTRACT.....	43
INTRODUÇÃO	44
MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
Isolados Bacterianos	45
Teste de susceptibilidade a antimicrobianos e detecção de ESBLs.....	46
Extração de DNA genômico e PCR para identificação do gene de <i>gyrA</i>	46
RFLP do gene <i>gyrA</i>	47
Prova de fermentação do adonitol	47
RESULTADOS.....	47
DISCUSSÃO	49
TABELAS E FIGURAS.....	52
REFERÊNCIAS.....	55
7. CONCLUSÕES	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
9. ANEXOS	68
ANEXO I-TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	69
ANEXO 2-FEMS MICROBIOLOGY LETTERS-TOP AUTHOR GUIDELINES.....	70

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços da terapia antimicrobiana, a mortalidade e morbidade associadas a casos de infecções hospitalares continuam significantes mundialmente. *Klebsiella pneumoniae* é um patógeno oportunista associado a infecções hospitalares graves como septicemias, pneumonias e infecções do trato urinário. Em humanos, *K. pneumoniae* pode estar presente na nasofaringe e no trato intestinal (KONEMAN *et al.*, 2001). Nos Estados Unidos, *K. pneumoniae* representa o quarto patógeno mais comum de pneumonia e septicemia em unidades de terapia intensiva (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003). De acordo com o “SENTRY Antimicrobial Surveillance Program” (BIEDENBACH *et al.*, 2004), *Klebsiella* spp. foi responsável por 7 a 10% das infecções nosocomiais sistêmicas, durante 1997 e 2003, na Europa, América Latina e América do Norte.

De acordo com o Programa de Vigilância Brasileiro MYSTIC, as bactérias Gram-negativas mais envolvidas em infecções hospitalares (septicemias e infecções urinárias e respiratórias) no Brasil são: *Pseudomonas aeruginosa* (30.3%), *Escherichia coli* (18.6%), *Klebsiella pneumoniae* (16.9%), *Acinetobacter baumannii* (8.8%) e *Enterobacter cloacae* (7.1%) (KIFFER *et al.*, 2005).

A resistência de *K. pneumoniae* a antimicrobianos representa um problema cada vez maior principalmente em isolados relacionados a infecções hospitalares, especialmente devido à prevalência crescente de cepas produtoras de ESBLs (Extended- Spectrum β -lactamases), que as tornam resistentes a cefalosporinas de 3^a geração, (ceftazidima, cefotaxima, cefoperazona) e ao monobactâmico aztreonam (DESHPANDE *et al.*, 2000; PATERSON *et al.*, 2003). Cepas de *K. pneumoniae* agentes de infecções nosocomiais também têm apresentado aumento de resistência à tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, quinolonas e aminoglicosídeos (BRISSE *et al.*, 2000; STOCK; WIEDMANN, 2001; BOUSA; CERCENADO, 2002).

Klebsiella pneumoniae exibe heterogeneidade genética, porém a associa o entre variabilidade genética, virulência e transmissibilidade de cepas de *K. pneumoniae* não   bem entendida, mas existe uma clara evidência do comportamento diferenciado de cepas geneticamente heterogêneas (BRISSE; VERHOEF, 2001).

Em estudos realizados na Europa, foi observado que dentro da espécie *K. pneumoniae* grupos filogenéticos diferentes podem ser distinguidos, pela análise da seq ncia dos genes constitutivos *gyrA* e *parC*. Baseado na varia o de nucleotídeos do gene *gyrA*, isolados de *K. pneumoniae* foram classificados dentro de três grupos filogenéticos chamados KpI, KpII e KpIII (BRISSE; VERHOEF, 2001). Isolados do grupo KpIII correspondem a uma nova espécie, *K. variicola* (ROSENBLUETH et al., 2004). No Brasil, ainda não foi investigada a ocorrência de grupos filogenéticos entre isolados de *K. pneumoniae*, entretanto, em recente estudo foi observado que isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de infec es hospitalares em Recife-PE, Brasil, foram agrupados em três padrões genéticos diferentes de acordo com a técnica de tDNA-PCR (LOPES et al., 2007). O método de rea o em cadeia da polimerase (PCR) seguido de análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos de restri o (PCR-RFLP) do gene *gyrA* foi desenvolvido recentemente como um método rápido para identificar espécies de *Klebsiella* e grupos filogenéticos (BRISSE et al., 2004).

Considerando que no Brasil não se têm estudos sobre a distribui o de grupos filogenéticos dentro da espécie *K. pneumoniae*, será importante investigar como estão distribuídos os grupos filogenéticos desta espécie em Recife-PE, Brasil, e se os grupos filogenéticos identificados são caracterizados por propriedades clínicas relevantes, como a origem de isolamento e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Klebsiella*

O gênero *Klebsiella*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é representado por bacilos Gram-negativos fermentadores de carboidratos, que fazem parte da microbiota entérica comensal, mas também são encontrados no meio ambiente (água, vegetais e solo).

Este gênero foi assim denominado por Edwin Klebs, microbiologista alemão do final do século XIX. O bacilo, agora conhecido como *Klebsiella*, também foi descrito por Carl Friedlander, e durante muitos anos o “bacilo de Friedlander” foi bem conhecido como causa de uma pneumonia grave e com frequência fatal (KONEMAN *et al.*, 2001).

As espécies de *Klebsiella* são imóveis, não esporuladas, e geralmente exibem colônias mucóides e de consistência viscosa quando encontradas em placas com meios de isolamento (Figura 1). Este microrganismo é envolvido por cápsulas polissacarídicas, nas quais estão presentes diferentes antígenos que permitem a diferenciação da *Klebsiella* em diversos sorotipos (JAWETZ *et al.*, 1996). Muitas cepas hidrolisam uréia lentamente e produzem uma cor rosa-pálida na superfície inclinada do ágar uréia de Christensen. A produção de indol a partir do triptofano pode ser utilizada para separar as duas espécies principais: *K. pneumoniae* é indol-negativa e *K. oxytoca* é indol-positiva. Algumas espécies de *Enterobacter* podem ser muito similares a espécies de *Klebsiella* em muitas provas, podendo ser diferenciadas basicamente pelas provas de motilidade e ornitina descarboxilase, nas quais espécies de *Enterobacter* são positivas e espécies de *Klebsiella* são negativas (KONEMAN *et al.*, 2001).



Figura 1. Isolamento de *Klebsiella pneumoniae* em ágar MacConkey.

(Fonte: <http://www.sciencephoto.com/images/imagePopUpDetails.html?pop=1&id=778740076&pviewid=&country=67&search=klebsiella&matchtype=FUZZY>)

Taxonomicamente, as espécies do gênero *Klebsiella* são classificadas em *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* ( RSKOV;  RSKOV, 1984). Usualmente refere-se   espécie *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* como *K. pneumoniae*, e às outras duas subespécies como *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis* como pode-se observar na Tabela 1 (PODSCHUM; ULLMANN, 1998). Tanto a *K. pneumoniae* quanto a *K. oxytoca* são as principais responsáveis por infec es hospitalares e na comunidade. A *K. ozaenae*   isolada do nariz em casos de ozena (atrofia fétida das mucosas) e a *K. rhinoscleromatis*   isolada de lesões granulomatosas destrutivas do rinoscleroma (TRABULSI *et al.*, 2002). *Klebsiella terrigena* e *K. planticola* eram inicialmente consideradas restritas a ambientes aquáticos e do solo, porém recentemente estas espécies têm sido isoladas de infec es respiratórias humanas (PODSCHUN; ULLMANN, 1992; _____, 1998). As espécies *K. terrigena*, *K. planticola* e *K. ornithinolytica* foram reclassificadas taxonomicamente, em um novo gênero chamado *Raoultella* (DRANCOURT *et al.*, 2001).

Tabela 1. Classifica o do gênero *Klebsiella* por diferentes sistemas taxonômicos (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

<i>Classifica�o por:</i>			
<i>Cowan</i>	<i>Bascomb</i>		<i>�rscov</i>
<i>K. aerogenes/K. edwardsii</i>	<i>K. aerogenes/oxytoca/edwardsii</i>	GrupoI	<i>K. pneumoniae</i>
Subsp. <i>Edwardsii</i>	<i>K. pneumoniae</i>		subsp. <i>Pneumoniae</i>
Subsp. <i>Atlantae</i>	sensu stricto		subsp. <i>Ozaenae</i>
<i>K. pneumoniae</i>	sensu lato		subsp. <i>Rhinoscleromatis</i>
<i>K. ozaenae</i>	<i>K. ozaenae</i>	GrupoII	<i>K. terrigena</i>
<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>		<i>K. planticola</i> (sin. <i>K. trevisanii</i>)
	<i>K. "grupo não nomeado"</i>		<i>K. ornithinolytica</i>
	<i>E. aerogenes</i>	GrupoIII	<i>K oxytoca</i>

Adaptado de: Koneman *et al.* (2001)

A estrutura filogenética do gênero *Klebsiella* tem sido recentemente analisada (BOYE; HANSEN, 2003; BRISSE; VERHOEF, 2001; DRANCOURT; RAOULT, 2005; ROSENBLUETH *et al.*, 2004). Esses estudos mostram a complexidade taxonômica deste organismo. Duas novas espécies foram descritas: (1) *Klebsiella variicola* que estava sendo identificada por métodos convencionais como *K. pneumoniae*, mas foi considerada como uma nova espécie baseado principalmente na análise das seqüências dos genes *rpoB*, *gyrA*, *mdh*, *infB*, *phoE* e *nifH*, pertencentes a várias linhagens, incluindo bactérias isoladas a partir de plantas e humanos (ROSENBLUETH *et al.*, 2004); e (2) *Klebsiella singaporensis*, baseado nas seqüências dos genes de rRNA 16S e do gene *rpoB*. Outras novas espécies de *Klebsiella* propostas, *K. milletis* e *K. senegalensis*, que não foram ainda formalmente descritas na base de dados de nucleotídeos do NCBI [HTTP://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/], podem aumentar esta lista no futuro (MARTÍNEZ *et al.*, 2004). *K. granulomatis* é um patógeno intracelular facultativo que não tem sido cultivado em meios tradicionais. Existem evidências para considerá-lo como uma subespécie de *K. pneumoniae* (BOYE; HANSEN, 2003; CARTER *et al.*, 1999).

Klebsiella pneumoniae é a espécie de maior importância clínica dentro desse gênero. Esses bacilos são isolados com frequência de amostras clínicas, associados a uma variedade de infecções que afetam as vias urinárias, o trato respiratório, as feridas cutâneas e, algumas vezes, causam septicemia e meningite (KONEMAN *et al.*, 2001), sendo uma das espécies mais envolvidas em infecções hospitalares, principalmente em pacientes imunodeprimidos (ELTAHAWY *et al.*, 1997; PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

Como são bactérias Gram-negativas, cepas de *K. pneumoniae* não encontram boas condições de crescimento na pele de humanos, sendo consideradas microbiota transitória. A frequência de isolamento da *K. pneumoniae* na orofaringe de pessoas saudáveis é 1% a 6% e no trato intestinal de 5 a 32%. Em pacientes hospitalizados, a taxa de detecção desta bactéria é de 77% em amostras de fezes e de 19% na nasofaringe (KONEMAN *et al.*, 2001). Essa

colonização pode ser a fonte de infecção imediata que geralmente ocorre em pacientes em condições debilitantes, como o alcoolismo, diabetes mellitus e doença obstrutiva crônica, tendo em vista que este microrganismo pode estar presente tanto na faringe como no trato intestinal dos humanos (KONEMAN *et al.*, 2001; AYLING-SMITH; PITT, 1990).

2.2 Resistência bacteriana e β -lactamases

Infecções hospitalares por *K. pneumoniae* são causadas principalmente por cepas multi-resistentes produtoras de beta-lactamases, enzimas que protegem isolados resistentes do efeito letal de antibióticos β -lactâmicos. A produção de β -lactamases por bactérias é um dos mecanismos mais eficientes de resistência a β -lactâmicos e evoluiu devido ao uso intensivo desses antibióticos em diversas áreas, como na agricultura, indústria e medicina. Surpreendentemente, cerca de 50% dos antimicrobianos produzidos em países industrializados é utilizado na suplementação de ração animal (AMYES, 1997).

As ESBLs são novos tipos de β -lactamases que conferem resistência a cefalosporinas de terceira geração, como a cefotaxima, ceftazidima, cefoperazona e a monobactâmicos, como o aztreonam (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; DESHPANDE *et al.*, 2000; PATERSON *et al.*, 2003). Cepas de *K. pneumoniae* agentes de infecções nosocomiais também têm apresentado aumento de resistência à tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, quinolonas e aminoglicosídeos (BRISSE *et al.*, 2000; STOCK; WIEDMANN, 2001; BOUSA; CERCENADO, 2002).

As ESBLs são proteínas bastante diversificadas, podendo ser agrupadas em quatro classes moleculares (A, B, C e D) ou em três principais grupos de acordo com a classificação de Bush *et al.* (1995): grupo 1, β -lactamases que hidrolizam cefalosporinas e que são pouco inibidas pelo ácido clavulânico (por exemplo, AmpC, MOX-1 e MIR-1); grupo 2, penicilinas, cefalosporinas e β -lactamases de amplo espectro (ESBLs) que geralmente são inibidas pelo ácido clavulânico (por exemplo, TEM, SHV, CAZ, CTX-M e OXA); e grupo 3,

metalo- β -lactamases que hidrolizam penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas e que não são inibidas pelo ácido clavulânico (por exemplo, CcrA e PCM). O grupo 2 engloba o maior número de β -lactamases, sendo dividido em oito subgrupos (2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e, 2f). As β -lactamases produzidas por cepas de *K. pneumoniae* são principalmente ESBLs do grupo 2, TEM, SHV e CTX-M (BUSH *et al.*, 1995; COQUE *et al.*, 2002; CHANAWONG *et al.*, 2002).

Métodos moleculares fornecem poderosas ferramentas para monitorar cepas bacterianas. A tipagem molecular contribui para a avaliação de surtos de infecção hospitalar, infecções recorrentes e disseminação clonal de patógenos específicos (SADER *et al.*, 1993; _____, 1995). Alguns programas de vigilância têm incorporado técnicas de tipagem molecular como um meio de proporcionar informação adicional, para detectar e avaliar o modo de disseminação de patógenos multirresistentes (PFALLER *et al.*, 2001).

O rápido aparecimento e disseminação de resistência a drogas entre bactérias têm provocado uma preocupação com o controle desses patógenos como uma prioridade estratégica para hospitais e o achado de clones dentro de um grupo fenotipicamente idêntico pode ter um impacto direto no método de intervenção terapêutica (HACEK *et al.*, 1999). Se isolados agregados são genotipicamente diferentes, então a agregação pode ser devido ao acaso ou ao agrupamento de vários pacientes altamente suscetíveis ou ainda à excessiva pressão dos antimicrobianos, resultando na seleção de um fenótipo resistente dentro de um grupo de isolados não relacionados (TOSIN *et al.*, 2003). A disseminação clonal de uma cepa resistente ilustra a necessidade de investigações mais extensas para identificar o mecanismo de propagação e para renovada atenção para esforços no controle de infecção.

2.3 Tipagem molecular de isolados de *K. pneumoniae*

Surtos de doenças infecciosas são resultantes, freqüentemente, da exposição a um agente etiológico de origem comum, cujos descendentes são geneticamente idênticos ou estritamente relacionados. Em termos epidemiológicos, os organismos envolvidos em surtos são relacionados clonalmente. Estes organismos são membros de uma mesma espécie e possuem fatores de virulência e características bioquímicas e genéticas semelhantes. Por outro lado, existe diversidade suficiente ao nível de espécie para que organismos isolados de diferentes fontes e regiões geográficas possam ser diferenciados ou classificados em subtipos ou linhagens (OLIVE; BEAN, 1999). Estas diferenças entre linhagens da mesma espécie são reflexos do acúmulo de mutações aleatórias não letais, incluindo substituições de pares de bases, deleção de genes individuais, ou mesmo aquisição de DNA de outras espécies bacterianas (ARBEIT, 1999).

O processo de tipagem é importante epidemiologicamente no reconhecimento de surtos de infecções, na detecção de transmissão cruzada de patógenos, na determinação da fonte de infecção e no monitoramento de programas de vacinação (OLIVE; BEAN, 1999). A tipagem de linhagens bacterianas tem sido realizada por diferentes métodos, que podem ser classificados em: métodos fenotípicos, que detectam características expressas pelas bactérias; e métodos genotípicos, que envolvem análise de DNA bacteriano.

Métodos moleculares para caracterização de isolados de *K. pneumoniae* que são usados com objetivos epidemiológicos incluem RAPD (BRISSE e VERHOEF, 2001; SOUZA LOPES *et al.*, 2005,) eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (ARLET *et al.*, 1994), e polimorfismo do comprimento do fragmento amplificado (AFLP) (JONAS *et al.*, 2004; VAN DER ZEE *et al.*, 2003). Entretanto, estes métodos são geralmente usados para investigação de surtos em nível local, já que sua reprodutibilidade é difícil de alcançar e que eles não produzem dados altamente informativos e claros. Ribotipagem tradicional representa uma

técnica altamente reprodutível e mostrou ser altamente discriminatória em *Klebsiella* quando usado *EcoRI* (BRISSE; VERHOEF, 2001). Contudo, a interpretação da variação do padrão de bandas tem limitações práticas e teóricas (GRIMONT; GRIMONT, 2001).

Outro método bastante promissor para a identificação bacteriana é a análise por PCR do polimorfismo do comprimento das regiões espaçadoras entre os genes que codificam os tRNAs (tDNA-PCR). Os genes do tRNA são altamente conservados entre espécies bacterianas e são úteis para estudos filogenéticos (VANDAMME *et al.*, 1996). Esta técnica geralmente produz padrões de bandas espécie-específicos e tem sido aplicada na identificação de espécies de *Streptococcus* (WELSH; MCCLELLAND, 1992; DE GHELDRE *et al.*, 1999), *Acinetobacter* (EHRESTEIN *et al.*, 1996), *Staphylococcus* (MAES *et al.*, 1997), *Listeria* (VANECHOUTTE *et al.*, 1998), *Bacillus* (DAFFONCHIO *et al.*, 1998), *Enterobacter* (CLEMENTINO *et al.*, 2001) e *K. pneumoniae* (LOPES *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de métodos para uma rápida diferenciação de isolados de *Klebsiella* na rotina em laboratórios de microbiologia clínica é necessário para esclarecer se existe ou não diferenças epidemiológicas ou patogênicas entre espécies de *Klebsiella* (LIU *et al.*, 1997). A associação entre variabilidade genética e virulência e transmissibilidade de cepas de *Klebsiella* não é bem entendida, mas existe uma clara evidência do comportamento diferenciado de cepas desse grupo bacteriano (BRISSE; VERHOEF, 2001). Em *Escherichia coli*, estudos têm demonstrado que fatores associados com patogenicidade são desigualmente distribuídos entre os diferentes grupos genéticos dessa espécie (BOYD; HARTL, 1998). Ao contrário do caso de surtos comunitários, a tipagem de microrganismos em surtos hospitalares pode ser essencial para identificar cadeias de transmissão por causa da natureza ubíqua dos microrganismos no meio hospitalar (ALVES *et al.*, 2006).

Subgrupos dentro de espécies são também determinados. Baseado na variação de nucleotídeos dos genes constitutivos *gyrA*, *parC* e *rpoB*, isolados de *K. pneumoniae* podem

ser classificados dentro de três grupos filogenéticos chamados KpI, KpII e KpIII, sendo o grupo KpII subdividido em KpII-A e KpII-B (BRISSE e VERHOEF, 2001; BRISSE *et al.*, 2004; FEVRE *et al.*, 2005). Uma espécie nova foi recentemente descrita, *K. variicola*, e parece corresponder a KpIII (ROSENBLUETH *et al.*, 2004).

Os grupos filogenéticos de *K. pneumoniae* podem ter características clínicas e epidemiológicas distintas, mas atualmente a ausência de esquemas de identificação para estes grupos está limitando a análise da sua distribuição em amostras clínicas. No estudo realizado por Brisse *et al* (2004), quando foram comparados os grupos filogenéticos e resistência a antimicrobianos, foi encontrado que para a maioria dos isolados de *Klebsiella*, o nível de resistência foi mais alto em KpI, intermediário em KpII, e mais baixo em KpIII. Para a maioria dos agentes antimicrobianos, a taxa de resistência em isolados KpI foi duas ou três vezes mais alta do que em isolados KpIII.

O método de PCR seguido de análise da PCR-RFLP do gene *gyrA* foi desenvolvido recentemente como um método rápido para identificar espécies de *Klebsiella* e grupos filogenéticos (BRISSE *et al.*, 2004). Este gene está presente em todas as cepas de *Klebsiella* e codifica a subunidade A da DNA girase, uma proteína que corresponde ao principal alvo de fluorquinolonas nesta bactéria (DEGUCHI *et al.*, 1997; BRISSE *et al.*, 1999). Embora menos informativo que o seqüenciamento do gene, a PCR-RFLP do gene *gyrA* é uma ferramenta útil para separar os isolados de *K. pneumoniae* nos seus três grupos filogenéticos, além de ser um método mais rápido e com um menor custo que o seqüenciamento de DNA (BRISSE *et al.*, 2004).

Outra ferramenta que facilita a identificação dos grupos filogenéticos é a capacidade dos isolados de *K. pneumoniae* em fermentar o adonitol. Rosenblueth e colaboradores encontraram que a inabilidade para fermentar o adonitol pode ser característica de *K. variicola* (KpIII), enquanto a maioria das cepas de *K. pneumoniae* são capazes de fermentar

esse carboidrato (ROSENBLUETH *et al.*, 2004). Contudo, Brisse e colaboradores (2004) relataram que essa característica metabólica está distribuída desigualmente entre os diferentes grupos filogenéticos KpI, KpII e KpIII.

O conhecimento das relações filogenéticas entre espécies e subespécies de *Klebsiella* fornece uma base para estudos sobre a distribuição de propriedades fenotípicas e características epidemiológicas implicadas na resistência e virulência (BRISSE; VERHOEF, 2001). Em *E. coli*, tem sido mostrado que fatores associados com patogenicidade são desigualmente distribuídos entre os grupos genéticos (BOYD; HARTL, 1998). Será importante investigar se os grupos filogenéticos identificados em isolados patogênicos e da microbiota normal de *K. pneumoniae* de Recife-PE são caracterizados por propriedades clínicas relevantes, como resistência a antimicrobianos e origem de isolamento.

3. PERGUNTA CONDUTORA

Os isolados hospitalares e comunitários de *K. pneumoniae* provenientes de Recife-PE estão agrupados em diferentes grupos filogenéticos e esses grupos apresentam diferentes características epidemiológicas e de resistência a antimicrobianos?

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Verificar se os isolados hospitalares e comunitários de *K. pneumoniae* provenientes de Recife-PE estão agrupados em diferentes grupos filogenéticos e se esses grupos estão relacionados com origem de isolamento e perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar os grupos filogenéticos de isolados de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* através da PCR-RFLP do gene *gyrA*;
- Determinar a capacidade dos isolados em fermentar o adonitol.
- Correlacionar os grupos filogenéticos identificados com a origem dos isolados de *K. pneumoniae*, capacidade em fermentar o adonitol e com o perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenho do estudo

Foi realizado, nesta pesquisa, um estudo do tipo experimental. Estudos a esse nível podem fornecer dados básicos importantes permitindo analisar os isolados de *K. pneumoniae* acerca de sua diversidade molecular e resistência a antimicrobianos, sob condições bem estabelecidas na literatura.

5.2 Isolados Bacterianos

Foram analisados 94 isolados de *K. pneumoniae* provenientes de infecções hospitalares, infecções comunitárias e da microbiota normal de pessoas saudáveis.

Os isolados hospitalares foram obtidos de quatro hospitais da rede pública de Recife-PE, sendo 12 provenientes do Hospital da Restauração (HR), 13 do Hospital das Clínicas (HC) da UFPE, 1 do Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP), 12 do Hospital Agamenon Magalhães (HAM) e 22 de um Hospital particular da cidade do Recife. Todos os isolados foram provenientes de diversas amostras clínicas (urina, secreção respiratória, ferida, e sangue) de diferentes pacientes (Tabela 1). Os 60 isolados hospitalares foram identificados bioquimicamente pelo sistema computadorizado Mini API ID 32E ou VITEK 2 (Bio Mérieux, França). Onze isolados patogênicos de *K. pneumoniae* provenientes de pessoas com infecções comunitárias foram fornecidos por laboratório particular de análises clínicas da cidade de Recife-PE, com identificação bioquímica convencional realizada previamente e posteriormente re-identificados pelos testes de fermentação de carboidratos, motilidade, produção de H₂S, indol, lisina descarboxilase.

Os isolados da microbiota normal (n = 23) foram obtidos da secreção de orofaringe e de fezes de crianças na faixa etária de 3 a 4 anos da Creche Lar Fabiano de Cristo do bairro da Várzea, Recife-PE. Para obtenção das amostras, houve permissão assinada pelos responsáveis (Termo de consentimento livre e esclarecido-Anexo1) de acordo com trabalho aprovado pelo

Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (protocolo de número 310/2003-CEP/CCS). Para obtenção da secreção de orofaringe foram utilizados “swabs” estéreis e abaixadores de língua. Para a coleta de fezes foram fornecidos aos responsáveis recipientes adequados. Para o isolamento de *K. pneumoniae* da microbiota normal foi utilizado o meio Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB). As colônias suspeitas foram semeadas nos meios TSI (Tríplice-açúcar-ferro), SIM (H₂S, Indol e Motilidade), citrato, lisina e caldo uréia, para identificação bioquímica primária (Figura 2). As culturas com características bioquímicas de *K. pneumoniae* tiveram sua identificação confirmada pelo Kit API 20E (Bio Mérieux), conforme instruções do fabricante.

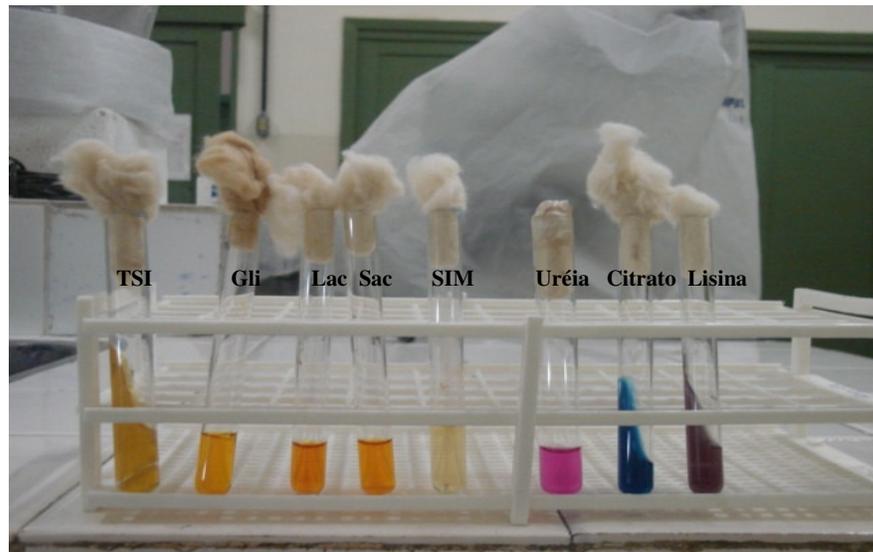


Figura 2. Testes bioquímicos convencionais para identificação de bactérias Gram-negativas e com resultado característico para *K. pneumoniae*. Fonte: o autor, 2008.

Todas as culturas estão preservadas em glicerol (20%) a -70°C e para as análises foram crescidas em Caldo Infuso Cérebro e Coração (BHI) a 37°C por 18 horas.

5.3 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

Foram realizados testes de susceptibilidade a agentes antimicrobianos dos isolados *K. pneumoniae* frente aos antibióticos: ampicilina, amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, aztreonam, imipenem, cefotaxima, ceftazidima, cloranfenicol, tetraciclina, estreptomicina e ácido nalidíxico. O inóculo bacteriano com turbidez comparada à 0.5 da escala de MacFarland foi semeado confluentemente em placas com meio Ágar Mueller-Hinton. Depois foram depositados os discos comercialmente disponíveis contendo os antimicrobianos citados de acordo com a técnica de difusão em disco proposta por Kirby e Bauer (NCCLS, 1997) e incubados a 37°C por 18 a 24 horas (Figura 3). O diâmetro do halo de resistência foi medido em milímetros comparado com tabela padrão (NCCLS, 1997) e então o microrganismo foi classificado como sensível, intermediário ou resistente.



Figura 3. Placa com meio Ágar Mueller-Hinton após incubação para teste de susceptibilidade a antimicrobianos pela técnica de difusão em disco proposta por Kirby e Bauer. Fonte: o autor, 2008.

5.4 Pesquisa de ESBLs

Para detecção fenotípica da produção de ESBLs foi utilizado o teste de sinergia de disco duplo (VERCAUTEREN *et al.*, 1997). O inóculo com turbidez de 0,5 da escala de MacFarland foi semeado confluentemente em Ágar Mueller-Hinton. Em seguida foram depositados em cada placa 1 disco de Ceftazidima, cefotaxima ou aztreonam e 1 disco de Amoxicilina/ ácido clavulânico com uma distância entre eles de 20 mm. As placas foram incubadas a 37°C por 18 a 24h. A observação do aumento da zona de inibição ao redor do

disco da cefalosporina de 3^a. geração em direção ao disco contendo clavulanato (inibidor de β -lactamase) é indicativa da produção de ESBLs pelo microrganismo (Figura 4). Como controle positivo foi utilizado um isolado ESBL positivo (K16R).



Figura 4. Placa com meio Ágar Mueller-Hinton após incubação para teste de detecção de ESBLs pelo teste de sinergia do disco duplo proposta por Vercauteren *et al.* (1997). Fonte: o autor, 2008.

5.5 Extração de DNA total ou genômico

A extração do DNA total dos 94 isolados de *K. pneumoniae* analisados foi realizada segundo Maniatis *et al* (1982) com exclusão da etapa de adição de lisozima. Os isolados bacterianos foram crescidos por 18 horas a 37°C e 1 ml da cultura foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e 500 μ l de Tris; EDTA (TE) (10:1) foram adicionados ao sedimento e o material novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 500 μ l de TE e 10 μ l de Proteinase K (5mg/ml), após homogeneização a suspensão foi incubada a 60°C por 20 minutos. A lise foi concluída adicionando-se 100 μ l de STE (2,5% SDS; 0,25M EDTA; 10mM Tris pH 8,0) e incubando por 15 minutos a 60°C. Após 5 minutos à temperatura ambiente e 5 minutos em gelo, foram acrescentados 130 μ l de acetato de potássio 5M, permanecendo a solução em gelo por 15 minutos para a precipitação do DNA, após homogeneização. Após a centrifugação por 10

minutos, o sobrenadante, aproximadamente 700 l, foi transferido para outro tubo e o mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamf lico (25:24:1) foi adicionado, seguido de centrifuga o por 5 minutos. O sobrenadante foi removido para outro tubo e o DNA precipitado com aproximadamente 420 l de isopropanol, sendo incubado a -20 C por 18 horas ou 20 min a -80 C. Em seguida, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos e ao precipitado seco foram adicionados 10 l de RNase (50 g/ml). O DNA extraído foi estocado a -20 C para análises posteriores.

5.6 Quantifica o do DNA total

O DNA de todos os isolados foi quantificado por compara o com quantidade conhecida do DNA do fago *lambda* clivado com a enzima *Hind* III (MANIATIS *et al.*,1982). Uma alíquota de 1,0 l do DNA extraído foi submetida   eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris-borato 0,089M;  cido bórico 0,089M; EDTA 0,002M)   temperatura ambiente e sob corrente constante de 20mA e 100V. Após a migra o, o DNA foi corado com brometo de etídio, observado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e registrado em sistema de fotodocumenta o Kodak.

5.7 Condi es da PCR para identifica o do gene de *gyrA*

A amplifica o do gene *gyrA* foi realizada pela técnica da PCR em todos os isolados com os iniciadores *gyrA*-A (5'-CGCGTACTATACGCCATGAACGTA-3') and *gyrA*-C (5'-ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG-3') (BRISSE; VERHOEF, 2001). Para cada isolado foram realizadas quatro rea o es de PCR. As rea o es de amplifica o foram preparadas em um volume total de 25 l por tubo, compreendendo: 20ng de DNA genômico, 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 0,16mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (Ludwig), 1,5mM de MgCl₂, 20pmol de cada iniciador, 50mM de KCl e 10mM de Tris-HCl, pH 8. Em

cada partida de amplificação, foi incluído um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf-Mastercycler Gradient) programado para 35 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 54°C e 30 segundos a 72°C. Após os 35 ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 5 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE e visualizados conforme descrito acima.

5.8 Purificação do produto de PCR

O produto de PCR foi submetido à purificação utilizando acetato de sódio/etanol. Após amplificação por PCR, juntou-se em um microtubo o conteúdo dos quatro tubos de reação totalizando 100µl. Foi adicionado ao material 0,3M de acetato de sódio pH 5,2 e 2,5 X o volume de etanol a 100% seguido de centrifugação a 14.000rpm por 3 minutos, incubando o material a -20°C por 30 minutos. Após esse período, o tubo foi submetido à centrifugação a 14.000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram adicionados 500µl de etanol a 70%. Em seguida, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos e ao precipitado seco foram adicionados 22µl de TE (10: 1) pH 8,0. Os produtos purificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE e visualizados conforme descrito acima para quantificação comparando o produto com quantidade conhecida do DNA do fago *lambda* clivado com a enzima *Hind* III.

5.9 RFLP do gene *gyrA*

Foram utilizadas, separadamente, as enzimas de restrição *TaqI* e *HaeIII* para digestão do produto de amplificação da PCR do gene *gyrA* (BRISSE *et al.*, 2004). As reações de digestão foram preparadas em um volume total de 20µl por tubo, compreendendo: 1000ng do

produto de PCR purificado, 2µl de tampão 10X recomendado para cada endonuclease utilizada, 10µg/µl de soroalbumina bovina (BSA) acetilado e 5U da endonuclease de restrição. A reação de digestão foi incubada a 37°C por 5 horas para a enzima HaeIII e a 65°C por 5 horas para a enzima TaqI. O produto final da reação de digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE a 120V por 2 horas e foi visualizado conforme descrito acima.

5.10 Prova de fermentação do adonitol

Uma colônia pura de cada isolado de *K. pneumoniae* foi inoculada em meio líquido para fermentação do adonitol (Meio base de vermelho de fenol acrescido de 0,5% de adonitol). Os tubos foram incubados por 24-48 horas a 37°C e após este período foi analisada a mudança de cor do indicador de pH do meio. Foi utilizada como controle positivo a linhagem de *K. pneumoniae* K2-R e como controle negativo uma cepa de *Proteus mirabilis* proveniente da bacterioteca do laboratório de Microbiologia do Departamento de Medicina Tropical-UFPE.

6. ARTIGO

ARTIGO ORIGINAL

(Artigo que será submetido para publicação na Revista FEMS MICROBIOLOGY LETTERS)

Grupos filogenéticos entre isolados hospitalares e comunitários de *Klebsiella pneumoniae* provenientes do Brasil: relação com resistência a antimicrobianos e origem de isolamento.

Phylogenetic groups in nosocomial and community *Klebsiella pneumoniae* isolates from Brazil: relationship with the antimicrobial resistance and origin of isolation.

Maíra Espíndola Silva de Melo^{1,4}

Adriane Borges Cabral²

Maria Amélia Vieira Maciel³

Vera Magalhães da Silveira³

Ana Catarina de Souza Lopes^{3,4}

Departamento de Medicina Tropical – Universidade Federal de Pernambuco

¹Mestranda do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical – UFPE

²Aluna de Iniciação Científica do Departamento de Medicina Tropical – UFPE

³Professoras do Departamento de Medicina Tropical – UFPE

⁴Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA) – UFPE

Endereço para correspondência:

Maíra Espíndola Silva de Melo.

Rua Avaré, 44. Jardim São Paulo, Recife-PE. CEP: 50790-360.

E-mail: maira_esl@yahoo.com.br

ABSTRACT

Ninety four isolates of *K. pneumoniae* obtained from community and hospital infections and from microflora of healthy children were analyzed to verify if isolates of *K. pneumoniae* from Brazil were grouped into different phylogenetic groups and if these groups were related with isolation origin and antimicrobial resistance profile. Thus, the isolates were analyzed by disk diffusion method for the antimicrobial susceptibility detection, by double disk synergy test for detection of ESBLs and by adonitol fermentation. PCR-RFLP of the *gyrA* gene, digested with restriction enzymes *TaqI* and *HaeIII*, was performed for identification of phylogenetic groups (KpI, KpII, KpIII). The PCR-RFLP showed a high occurrence of KpI group, in hospital and community isolates. On the other hand, KpII and KpIII groups were found mainly in normal microbiota isolates and in less proportion in pathogenic isolates. The resistance to the third-generation cephalosporins, aztreonam, imipenem, amoxicillin/clavulanic acid and streptomycin was observed only in isolates of group KpI. The highest percentages of resistance were found in the KpI group, followed by groups KpII and KpIII. Differences in the distribution, frequency, origin and resistance of the *K. pneumoniae* phylogenetic groups observed in this study, suggest distinct pathogenic and epidemiological characteristics among the three groups, which may be relevant for the control of infections caused by *K. pneumoniae*. This is the first study about the distribution of filogenetics groups KpI, KpII and KpIII in Brazil and also in isolates from normal microbiota.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*. Phylogenetic groups. Antimicrobial Resistance.

INTRODUÇÃO

A resistência de *K. pneumoniae* a antimicrobianos representa um problema cada vez maior principalmente em isolados relacionados a infecções hospitalares, especialmente devido à prevalência de cepas produtoras de ESBLs (Extended-Spectrum β -lactamases), que as tornam resistentes a cefalosporinas de 3ª geração (ceftazidima, cefotaxima, cefoperazona) e ao monobactâmico aztreonam (Deshpande *et al.*, 2000; Paterson *et al.*, 2003). Esta espécie também tem apresentado aumento de resistência à tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, quinolonas, aminoglicosídeos e carbapenêmicos (Brisse *et al.*, 2000; Stock & Wiedmann, 2001; Bousa & Cercenado, 2002; Woodford *et al.*, 2004; Lincopan *et al.*, 2005).

Klebsiella pneumoniae exibe heterogeneidade genética, porém a associação entre variabilidade genética, virulência e transmissibilidade de cepas de *K. pneumoniae* não é bem entendida, mas existe uma clara evidência do comportamento diferenciado de cepas geneticamente heterogêneas (Brisse & Verhoef, 2001).

Em estudos realizados na Europa, foi observado que dentro da espécie *K. pneumoniae* grupos filogenéticos diferentes podem ser distinguidos pela análise da sequência dos genes constitutivos *gyrA* e *parC*. Baseado na variação de nucleotídeos do gene *gyrA*, isolados de *K. pneumoniae* foram classificados dentro de três grupos filogenéticos chamados KpI, KpII e KpIII (Brisse & Verhoef, 2001). Isolados do grupo KpIII correspondem a uma nova espécie, *K. variicola* (Rosenblueth *et al.*, 2004). No Brasil, ainda não foi investigada a ocorrência de grupos filogenéticos entre isolados de *K. pneumoniae*, entretanto, em recente estudo foi observado que isolados clínicos provenientes de infecções hospitalares em Recife-PE, Brasil, foram agrupados em três grupos genéticos diferentes de acordo com a tDNA-PCR (Lopes *et al.*, 2007). O método de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguido de análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) do gene *gyrA* foi

desenvolvido recentemente como um método rápido para identificar espécies de *Klebsiella* e grupos filogenéticos (Brisse *et al.*, 2004).

Considerando que no Brasil não existem estudos sobre a distribui o dos grupos filogenéticos KpI, KpII e KpIII, o objetivo desse estudo foi, através do gene *gyrA*, investigar como estão distribuídos os grupos filogenéticos entre isolados clínicos e da microbiota normal de *K. pneumoniae* e se esses grupos estão associados a propriedades clínicas relevantes, como a origem de isolamento e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados Bacterianos

Foram analisados 94 isolados de *K. pneumoniae* provenientes de infec es hospitalares, infec es comunitárias e da microbiota normal de crianças saudáveis, em Recife-PE, Brasil, entre os anos de 1998 e 2008 (Tabela 1). Os 60 isolados hospitalares foram obtidos de quatro hospitais da rede pública e de um hospital particular de Recife-PE, provenientes de diversas amostras clínicas de diferentes pacientes. Onze isolados patogênicos de *K. pneumoniae* provenientes de pessoas com infec es comunitárias foram fornecidos por laboratório particular de análises clínicas. Os isolados da microbiota normal (n = 23) foram obtidos da secre o de orofaringe e de fezes de crianças saudáveis, com idades entre 3 e 4 anos de uma creche pública. Todos os isolados foram identificados pelo sistema automatizado Kit API 20E (Bio Mérieux, França). Para obten o das amostras das crianças, houve permissão assinada pelos responsáveis (termo de consentimento livre e esclarecido – anexo 1) de acordo com trabalho aprovado pelo Comitê de  tica em Pesquisas com Seres Humanos (protocolo de número 310/2003-CEP/CCS/UFPE/Brasil).

Todas as culturas foram preservadas em glicerol (20%) a -70°C e para as análises foram crescidas em Caldo Infuso Cérebro e Coração (BHI) a 37°C por 18 horas.

Teste de susceptibilidade a antimicrobianos e detecção de ESBLs

Todos os isolados foram submetidos ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos de acordo com a técnica de difusão em disco (NCCLS, 1997). Foram testados os seguintes antibióticos: ampicilina, amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, aztreonam, imipenem, cefotaxima, ceftazidima, cloranfenicol, tetraciclina, estreptomicina e ácido nalidíxico. Os isolados também foram analisados pelo teste de sinergia do disco duplo para detecção de ESBLs, de acordo com Vercauteren *et al.* (1997).

Extração de DNA genômico e PCR para identificação do gene de *gyrA*

A extração do DNA total dos 94 isolados de *K. pneumoniae* analisados foi realizada segundo Maniatis *et al* (1982).

A amplificação do gene *gyrA* foi realizada pela técnica da PCR em todos os isolados com os iniciadores *gyrA*-A (5'-CGCGTACTATACGCCATGAACGTA-3') and *gyrA*-C (5'-ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG-3') (Brisse & Verhoef, 2001). As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25µl por tubo, compreendendo: 20ng de DNA genômico, 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 0,16mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (Promega), 1,5mM de MgCl₂, 20pmol de cada iniciador, 50mM de KCl e 10mM de Tris-HCl, pH 8. Em cada partida de amplificação, foi incluído um controle negativo, com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf-Mastercycler Gradient) programado para 35 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto a 94 1C, 30 segundos a 54 1C

e 30 segundos a 72 °C. Após os 35 ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 5 minutos a 72 °C. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE, corados com brometo de etídeo. O produto de PCR foi submetido à purificação utilizando acetato de sódio/etanol (Maniatis *et al.*, 1982).

RFLP do gene *gyrA*

Foram utilizadas separadamente as enzimas de restrição *TaqI* e *HaeIII* para digestão do produto de amplificação da PCR do gene *gyrA* (Brisse *et al.*, 2004). As reações de digestão foram preparadas a partir de 1000 ng do DNA amplificado em um volume total de 20 µl por tubo, conforme instruções do fabricante para cada endonuclease. O produto final da reação de digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE.

Prova de fermentação do adonitol

Para detecção da fermentação do adonitol, uma colônia de cada isolado de *K. pneumoniae* foi inoculada em meio base de vermelho de fenol adicionado de 0,5 % de adonitol.

RESULTADOS

A RFLP do gene *gyrA* evidenciou a ocorrência de três grupos filogenéticos entre os 94 isolados de *K. pneumoniae* investigados (Tabela 1). O uso das enzimas *TaqI* e *HaeIII* separadamente foi capaz de distinguir entre KpI (perfis *TaqI*-B e *HaeIII*-C), KpII (perfis *TaqI*-E e *HaeIII*-C ou *HaeIII*-D) e KpIII (Perfis *TaqI*-B e *HaeIII*-B) (figura 1). No total, 75

isolados (79,7%) foram do grupo KpI, 12 (12,8%) pertenceram ao grupo KpII e sete (7,5%) ao grupo KpIII.

As fontes de isolamento mais freqüentes dos isolados de *K. pneumoniae* de origem hospitalar foram: urina (55%), secreção respiratória (16,7%), sangue (6,7%), e ferida (6,7%). Com relação aos isolados patogênicos de origem comunitária, 90,9% foram provenientes de amostras de urina, sendo um isolado de amostra de sangue. As linhagens da microbiota normal foram isoladas de amostras de fezes (78,2%) e secreção da orofaringe (21,8%). Todos isolados analisados nesse trabalho estão descritos na tabela 1.

Na tabela 1 também podemos observar que 100% dos isolados pertencentes ao grupo KpI e 92,3% dos isolados do grupo KpII, foram capazes de fermentar o adonitol, enquanto nenhum isolado do grupo KpIII apresentou essa característica bioquímica.

A figura 2 mostra a associação entre os grupos filogenéticos encontrados com origem e ano de isolamento das linhagens de *K. pneumoniae*. Pode-se observar que os isolados de origem hospitalar apresentam um aumento proporcional na ocorrência do grupo filogenético KpI com o passar dos anos, enquanto que os grupos KpII e KpIII possuem percentuais reduzidos de ocorrência. Isolados provenientes de infecções comunitárias e da microbiota normal apresentaram uma maior proporção dos grupos KpII e KpIII (9,1% e 17,4%, respectivamente) quando comparados com isolados de infecções hospitalares.

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi bastante diverso considerando os diferentes grupos filogenéticos encontrados e origem dos isolados. Na tabela 2, pode-se constatar que a maioria dos isolados de *K. pneumoniae* foram resistentes a ampicilina e amoxicilina. A resistência às cefalosporinas de 3ª geração, aztreonam, imipenem, amoxicilina/clavulano e estreptomicina somente foi observada em isolados do grupo KpI. Os maiores percentuais de resistência foram encontrados no grupo KpI, seguido dos grupos KpII e KpIII.

Dentre os isolados do grupo KpI, a maioria (69,3%) foi classificada como multirresistente (resistentes a quatro ou mais drogas utilizadas), sendo a maior parte destes (94,2%) representada por isolados de origem hospitalar e 5,7% provenientes de infecções comunitárias. Por outro lado, isolados pertencentes aos grupos KpII ou KpIII apresentaram um baixo percentual de multirresistência (Tabela 3). Foi observada também a produção de ESBLs por 29,3% dos isolados do grupo KpI e por 16,7% dos isolados do grupo KpII, todos de origem patogênica. Isolados de origem não patogênica (microbiota normal) não apresentaram multirresistência ou produção de ESBLs.

DISCUSSÃO

A PCR-RFLP do gene constitutivo *gyrA* realizada nos isolados de *K. pneumoniae* de Recife-PE, Brasil, permitiu a distinção de três grupos filogenéticos, assim como foi descrito para essa espécie em outros países (Brisse & Verhoef, 2001; Brisse *et al.*, 2004; Rosenblueth *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2006). No entanto, este é o primeiro estudo a investigar os grupos filogenéticos de isolados *K. pneumoniae* provenientes da microbiota normal.

Foi observado que a distribuição percentual dos grupos filogenéticos foi diferente para cada origem de isolamento. Em todas as origens, a proporção de isolados do grupo KpI foi superior aos demais grupos, mas em isolados da microbiota normal foi encontrado um número maior de isolados pertencentes aos grupos KpII e KpIII quando comparados com as origens de isolamento de infecção hospitalar e comunitária. De acordo com Brisse e colaboradores (2004), o grupo KpI representa mais de 80% dos isolados clínicos e apresenta taxas de resistência à maioria dos agentes antimicrobianos maiores do que em KpII e KpIII.

De acordo com Rosenblueth e colaboradores (2004), isolados de *K. variicola* (ou isolados KpIII) não fermentam adonitol, uma característica geral de cepas de *K. pneumoniae*. Contudo, alguns isolados de *K. pneumoniae* podem ser adonitol negativos (Farmer *et al.*, 1985), e *K. variicola* podem ser adonitol positivos (Brisse *et al.*, 2004). No presente estudo, todos os isolados de *K. variicola* (KpIII) foram adonitol negativos, portanto, a fermentação do adonitol é uma prova bioquímica importante para identificação dessa espécie.

Foi observado um aumento da ocorrência do grupo KpI em isolados hospitalares entre 1998 e 2008. Esse fato pode ser consequência de altas taxas de resistência, já que a resistência é um parâmetro crítico para a transmissão deste patógeno oportunista em ambientes hospitalares. Assim, se justifica a observação de que os isolados pertencentes ao grupo KpI foram os únicos a apresentar resistência a antimicrobianos importantes como cefalosporinas de 3ª geração e aztreonam, embora isolados KpII e KpIII apresentaram resistência intermediária.

Cerca de 13,3% dos isolados hospitalares do grupo KpI também apresentaram resistência ao antibiótico carbapenêmico imipenem, que é considerado por muitas vezes o último recurso na terapia antimicrobiana quando são isoladas linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs (Nordmann & Poirel, 2002; Poirel *et al.*, 2004; Ikonomidis *et al.*, 2005). Esta resistência a carbapenêmicos em *K. pneumoniae* é rara e causada principalmente devido a super-produção de β -lactamases AmpC (grupo 1, classe C), associada com a perda de porinas, proteínas de membrana externa presentes na parede celular de bactérias Gram-negativas (Kob *et al.*, 2001; Moland *et al.*, 2003; Woodford *et al.*, 2004; Bratu *et al.*, 2005;). No Brasil, o primeiro e único relato da ocorrência de um isolado de *K. pneumoniae* produtor de carbapenemases (IMP-1) ocorreu em 2003 no Hospital das Clínicas da cidade de São Paulo (Lincopan *et al.*, 2005). Portanto, este é o segundo relato no Brasil e primeiro relato em Recife de isolados de *K. pneumoniae* resistentes ao imipenem.

A maioria dos isolados de *K. pneumoniae* são naturalmente resistentes a ampicilina, devido a uma β -lactamase cromossômica de classe A expressa constitutivamente (Haeggman, *et al.*, 2004; Livermore, 1995; Stock & Wieddemann, 2001). Em todos os isolados patogênicos de *K. pneumoniae* estudados foi observada resistência a ampicilina e amoxicilina. O mesmo não ocorreu nos isolados da microbiota normal, pois houve percentuais significativos de sensibilidade a esses antimicrobianos nesses isolados, indicando que a resistência a ampicilina não é inerente à espécie *K. pneumoniae*.

K. pneumoniae é ainda um importante produtor de ESBLs não só no meio ambiente hospitalar, mas também na comunidade (Asensio *et al.*, 2000; García San Miguel *et al.*, 2007). Neste estudo, a produção de ESBLs foi observada somente em isolados patogênicos, 29,3% em isolados KpI e 16,7% em isolados KpII. Embora estudos anteriores relatem a produção de ESBLs por espécies de *K. variicola* (Alves *et al.*, 2006), os isolados de *K. variicola* identificados no presente estudo não expressaram fenotipicamente esta característica.

As diferenças na distribuição e frequência dos grupos filogenéticos de *K. pneumoniae* observadas neste estudo sugerem características clínicas e epidemiológicas distintas entre os três grupos, o que pode ser relevante para o controle de infecções causadas por *K. pneumoniae*.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Fonte de isolamento, origem e grupos filogenéticos dos isolados de *K. pneumoniae* provenientes de Recife-PE, Brasil.

Identificação do Isolado ^(a)	Fonte de isolamento	Origem	Grupo filogenético	Fermentação do adonitol
K2R, K11R, K16R, K19R, K3C, K6C, K8C, K10C, K15C, K16C, K2A, K5A, K6A, K8A, K10A, K11A, K12A, K1P, K2P, K7P, K8P, K11P, K12P, K15P, K17P, K18P, K19P, K20P	Urina	Hospitalar	KpI	+
K18R, K20R, K7C, K12C, K18C	Urina	Hospitalar	KpII	+
K17C	Urina	Hospitalar	KpIII	-
K6R, K13R, K14R, K17R, K7A, K9A, K13P, K22P	Secreção respiratória	Hospitalar	KpI	+
K10R	Secreção respiratória	Hospitalar	KpII	+
K4A	Secreção respiratória	Hospitalar	KpIII	-
K15R, K5P, K6P, K14P	Sangue	Hospitalar	KpI	+
K4C, K13C, K14C, K3A	Ferida	Hospitalar	KpI	+
K21I	Fezes	Hospitalar	KpI	+
K1A, K16P	Cateter	Hospitalar	KpI	+
K3P	Fragmento ósseo	Hospitalar	KpI	+
K4P	Escarro	Hospitalar	KpII	+
K9P	Secreção abscesso	Hospitalar	KpI	+
K10P	Secreção Coto	Hospitalar	KpI	+
K21P	Secreção peritonial	Hospitalar	KpI	+
K3CM, K6CM, K8CM, K10CM, K11CM, K12CM, K18CM, K19CM	Urina	Comunidade	KpI	+
K4CM	Sangue	Comunidade	KpI	+
K9CM	Urina	Comunidade	KpIII	-
K13CM	Urina	Comunidade	KpII	+
K3.1-F, K21.1-F	Fezes	Microbiota	KpIII	-
K3.2-F	Fezes	Microbiota	KpII	-
K10.1-F, K13.3-F, K24.1-F	Fezes	Microbiota	KpII	+
K6.3-F, K7.1-F, K7.2-F, K10.2-F, K21.2-F, K24.2-F, K51.1-F, K58.1-F, K58.2-F, K63.1-F, K63.2-F, K68-F	Fezes	Microbiota	KpI	+
K22-ORO, K2.2-ORO, K112.1-ORO	Secreção da orofaringe	Microbiota	KpI	+
K106.1-ORO, K2.3-ORO	Secreção da orofaringe	Microbiota	KpIII	-

(a) Identificação dos isolados: K - *K. pneumoniae*; R - Hospital da Restauração; C - Hospital das Clínicas da UFPE; A - Hospital Agamenon Magalhães; P - Hospital Particular; I - Instituto Materno Infantil de Pernambuco - IMIP; CM - Infecções comunitárias; F - Fezes (microbiota normal); ORO - Secreção da orofaringe (microbiota normal).

Tabela 2. Proporção de isolados de *K. pneumoniae* sensíveis, intermediários e resistentes aos antimicrobianos testados entre os três grupos filogenéticos encontrados.

	Sensível (%)			Intermediário (%)			Resistente (%)		
	KpI	KpII	KpIII	KpI	KpII	KpIII	KpI	KpII	KpIII
Ampicilina	1,3	8,3	28,6	0	0	0	98,7	91,7	71,4
Amoxicilina	0	25	14,3	1,3	0	14,3	98,7	75	71,4
Amoxicilina-clavulanato	82,7	100	100	2,7	0	0	14,6	0	0
Aztreonam	61,3	100	85,7	0	0	14,3	38,7	0	0
Cefotaxima	44	66,7	85,7	13,3	33,3	14,3	42,7	0	0
Ceftazidima	60	100	100	2,7	0	0	37,3	0	0
Imipenem	86,7	100	100	0	0	0	13,3	0	0
Ácido nalidíxico	80	100	85,7	4	0	0	16	0	14,3
Cloranfenicol	66,7	75	85,7	6,7	8,3	14,3	26,6	16,7	0
Tetraciclina	64	50	85,7	12	25	0	24	25	14,3
Estreptomomicina	90,7	83,3	85,7	8	16,7	14,3	1,3	0	0

Tabela 3: Correlação entre resistência a antimicrobianos de diferentes classes e produção de ESBLs por isolados de diferentes grupos filogenéticos de *K. pneumoniae*.

Grupo filogenético	Nº de isolados	Nº de isolados multirresistentes ^a (Origem)	Nº de isolados ESBL positivos ^b (Origem)
<i>K. pneumoniae</i> grupo KpI	75	49 (Hospitalares) 3 (Comunidade) 69,3%	20 (Hospitalares) 2 (Comunidade) 29,3%
<i>K. pneumoniae</i> grupo KpII	12	4 (Hospitalares) 33,3%	2 (Hospitalares) 16,7%
<i>K. pneumoniae</i> grupo KpIII	7	1 (Hospitalar) 14,2%	0

^a Os Isolados foram considerados multirresistentes quando apresentaram resistência a 4 ou mais das drogas utilizadas.

^b Detecção fenotípica de produção de ESBLs.

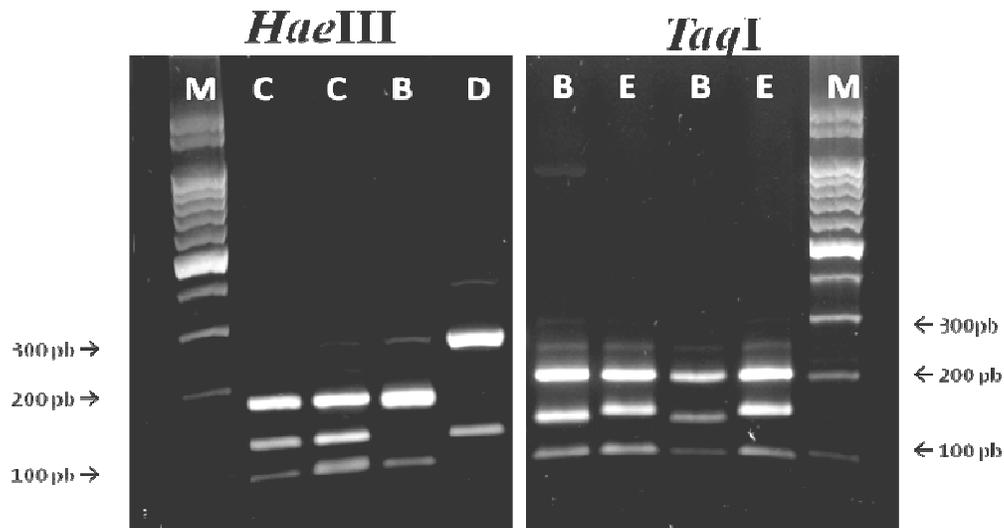


Figura 1. Exemplos de perfis de restrição obtidos após digestão do produto de PCR do gene *gyrA* de 441 pb com as enzimas *TaqI* e *HaeIII*. Os códigos dos perfis são indicados por uma letra acima de cada linha. M: Marcador de 100 pb (Amresco). O perfil *HaeIII*-B consiste em fragmentos de 175 pb, 174 pb e 92 pb, o perfil *HaeIII*-C em fragmentos de 175 pb, 129 pb, 92 pb e 45 pb e o Perfil *HaeIII*-D em fragmentos de 267 pb, 129 pb e 45 pb. O perfil *TaqI*-B apresenta fragmentos de 197 pb, 142 pb, 93 pb e 9 pb e o perfil *TaqI*-E fragmentos de 197 pb, 151 pb e 93 pb.

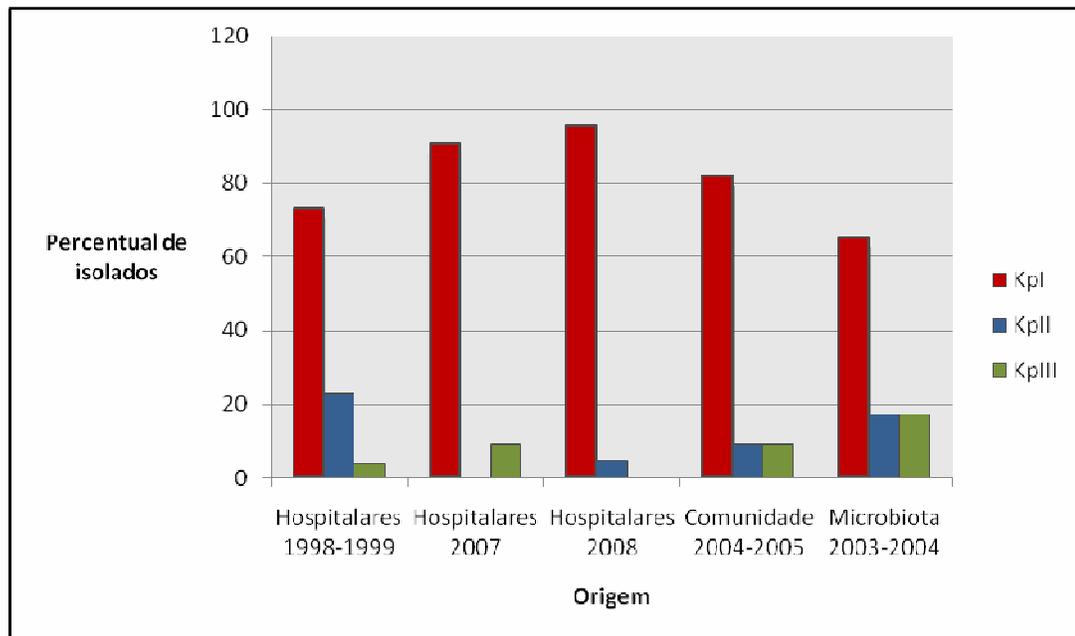


Figura 2. Distribuição dos diferentes grupos filogenéticos de isolados de *K. pneumoniae* provenientes de Recife-PE, Brasil, de acordo com a origem e ano de isolamento.

REFERÊNCIAS

1. Alves MS; Dias RCS; Castro ACD; Riley LW; Moreira BM (2006). Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 44 (10): 3640-3646.
2. Asensio A; Oliver A; González-Diego P; Baquero F; Pérez-Díaz JC; Ros P; Cobo J; Palacios M; Lasheras D; Cantón R (2000). Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clinical Infectious Diseases* 230: 55-60.
3. Bousa, E & Cercenado E (2002). *Klebsiella* and *Enterobacter*: antibiotic resistance and treatment implications. *Seminars in Respiratory Infections* 17: 215-230.
4. Bratu S; Landman D; Haag R; Recco R; Eramo A; Alam M; Quale J (2005). Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City. *Archives International of Medicine* 165: 1430-1435.
5. Brisse S; Milatovic D; Fluit AC; Verhoef J; Schmitz FJ (2000). Epidemiology of quinolone resistance of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology Infection Diseases* 19: 64-68.
6. Brisse S; Van Himbergen T; Kusters K; Verhoef J (2004). Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection* 10 (10): 942-945.
7. Brisse S & Verhoef J (2001). Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 915-924.
8. Deshpande L; Pfaller M A; Jones RN (2000). In vitro activity of ceftiofur tested against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* including extended-spectrum beta-lactamase producing strains. *Internacional Journal of Antimicrobial Agents* 15: 271-275.
9. Farmer JJ; Davis III BR; Hickman-Brenner F W; et al (1985). Biochemical identification of new species and biotypes of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 21: 46-76.
10. García San Miguel L; Cobo J; Valverde A; Coque TM; Diz S; Grill,F; Cantón R (2007). Clinical variables associated with the isolation of *Klebsiella pneumoniae* expressing different extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 13, p. 532-538, 2007.
11. Haeggman S; Löfdahl S; Paauw A; Verhoef J; Brisse B (2004). Diversity and evolution of the class a chromosomal beta-lactamase gene in *klebsiella pneumoniae*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48 (7): 2400–2408.

12. Ikonomidis A; Tokatlidou D; Kristo I; Sofianou D; Tsakris A; Mantzana P; Pournaras S; Maniatis NA (2005). Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a *bla*VIM-1 metallo- β -lactamase gene. *Clinical Microbiology and Infection* 43: 5344-5347.
13. Kob TH; Sng LH; Babini GS; Woodford N; Livermore DM; Hall LMC (2001). Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Singapore producing IMP-1 beta-lactamase and lacking an outer membrane protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 1939-1940.
14. Lincopan N; McCulloch JA; Reinert C; Cassettari VC; Gales AC; Mamizuka EM (2005). First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 516-519.
15. Livermore DM (1995). β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 8: 557-584.
16. Lopes ACS; Rodrigues JF; Clementino MBM; Miranda CAC; Nascimento APA; Morais J nior MA (2007). Application of PCR ribotyping and tDNA-PCR for *Klebsiella pneumoniae* identification. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102(7): 827-832.
17. Maniatis T; Fritsch EF; Sambrook J (1982). **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Laboratory Press. pp.368-369.
18. Moland ES; Hanson ND; Herrera VL; Black JA; Lockhart TJ; Hossain A; Johnson JA; Goering RV; Thomson KS (2003). Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 51: 711-714.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; 6th ed. M2A6. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Wayne, Pa.
20. Nordmann P & Poirel L (2002). Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection* 8: 321-331.
21. Paterson DL; Hujer KM; Hujer AM; Yeiser B; Bonomo MD; Rice LB; Bonomo RA (2003). Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrobials Agents Chemotherapy* 47: 3554-3560.
22. Poirel L; H ritier C; Tol n V; Nordmann P (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 15-22.
23. Rosenblueth M; Martínez L; Silva J; Martínez-Romero E (2004). *Klebsiella variicola*,

a novel species with clinical and plant associated isolates. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 27–35.

24. Stock J & Wiedemann B (2001). Natural antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* and *K. terrigena* strains. *Journal of Medical Microbiology* 50: 396-406.
25. Vercauteren E; Descheemaeker P; Ieven M; Sanders CC; Goossens H (1997). Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum β -lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 2191-2197.
26. Woodford N; Tierno PM; Young K. et al (2004). Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 4793-4799.

7. CONCLUSÕES

- Os isolados de *K. pneumoniae* provenientes de Recife-PE, Brasil, estão divididos em três grupos filogenéticos: KpI, KpII e KpIII, com maior ocorrência do grupo KpI.
- Isolados de infecções hospitalares e comunitárias apresentam um alto percentual de linhagens do grupo KpI quando comparados a isolados da microbiota normal. Por outro lado, isolados não patogênicos apresentam uma ocorrência relativamente elevada dos grupos KpII e KpIII.
- Todos os isolados pertencentes ao grupo KpI e a maioria dos isolados do grupo KpII, foram capazes de fermentar o adonitol, enquanto nenhum isolado do grupo KpIII apresentou essa característica bioquímica.
- O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi bastante diverso considerando os diferentes grupos filogenéticos encontrados e origem dos isolados. Os maiores percentuais de resistência foram encontrados no grupo KpI, seguido dos grupos KpII e KpIII.
- A produção de ESBLs foi observada em isolados do grupo KpI e em isolados do grupo KpII, todos de origem patogênica. Isolados de origem não patogênica (microbiota normal) não apresentaram multirresistência ou produção de ESBLs.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, M. S.; DIAS, R. C. S.; CASTRO, A. C. D.; RILEY, L. W.; MOREIRA, B. M. Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, no. 10, p. 3640-3646, 2006.
2. AMYES, S.G.B.; GEMELL, C.G. Antibiotic resistance. Resistance mediated by inhibitor-resistant and extended-spectrum TEM and SHV beta-lactamases. **The Journal of Medical Microbiology**, v.46, p.454-457, 1997.
3. ARBEIT, R.D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. (Eds.). **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 116-137.
4. ARLET, G.; ROUVEAU, M.; CASIN, I.; BOUVET, P. J.; LAGRANGE, P.H.; PHILIPPON, A. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 beta-lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 2553–2558, 1994.
5. ASENSIO, A.; OLIVER, A.; GONZ ALEZ-DIEGO, P.; BAQUERO, F.; P EREZ-D IAZ, J. C.; ROS, P.; COBO, J.; PALACIOS, M.; LASHERAS, D.; CANT ON, R. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. **Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 230, p. 55-60, 2000.
6. AYLING-SMITH, B.; T. L. PITT. State of the art in typing: *Klebsiella* spp. **Journal of Hospital Infection**, v. 16, p. 287-295, 1990.
7. BIEDENBACH, D.J.; MOET, G.J.; JONES, R.N. Ocurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infections isolate from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.50, p.59-69, 2004.
8. BOUSA, E.; CERCENADO, E. *Klebsiella* and *Enterobacter*: antibiotic resistance and treatment implications. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 17, p. 215-230, 2002.
9. BOYD, E. F.; HARTL, D. L. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 1159-1165, 1998.
10. BOYE, K.; HANSEN, D. S. Sequencing of 16S rDNA of *Klebsiella*: taxonomic relations within the genus and to other *Enterobacteriaceae*. **International Journal of Medical Microbiology: IJMM**, v. 292, p. 495-503, 2003.
11. BRATU, S.; LANDMAN, D.; HAAG, R.; RECCO, R.; ERAMO, A.; ALAM, M.; QUALE, J. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City. **Archive International of Medicine**, v. 165, p. 1430-1435, 2005.
12. BRISSE, S.; MILATOVIC, D.; FLUIT, A. C.; VERHOEF, J.; MARTIN, N.; SCHEURING, S.; KOHRER, K.; SCHMITZ, F. J. Comparative in vitro activities of ciprofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and trovafloxacin against

- Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, and *Enterobacter aerogenes* clinical isolates with alterations in GyrA and ParC proteins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 2051-2055, 1999.
13. BRISSE, S.; MILATOVIC, D.; FLUIT, A. C.; VERHOEF, J.; SCHMITZ, F. J. Epidemiology of quinolone resistance of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in Europe. **European Journal of Clinical Microbiology Infection Diseases**, v. 19, p. 64-68, 2000.
 14. BRISSE, S.; VAN HIMBERGEN, T.; KUSTERS, K.; VERHOEF, J. Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, No.10, p.942-945, 2004.
 15. BRISSE, S.; VERHOEF, J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 915-924, 2001.
 16. BUSH, K.; JACOBY, G.A; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.1211-1223, 1995.
 17. CARTER, J. S.; BOWDEN, F. J.; BASTIAN, I.; MYERS, G. M.; SRIPRAKASH, K. S.; KEMP, D. J. Phylogenetic evidence for reclassification of *Calymmatobacterium granulomatis* as *Klebsiella granulomatis* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1695-1700, 1999.
 18. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from january 1992 through june 2003, issued August 2003. **American Journal of Infection Control**, v.31, p.481-489, 2003.
 19. CHANAWONG, A.; M'ZALI, F.H.; HERITAGE, G.; XIONG, J.H.; HAWKEY, P.M. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the people's Republic of China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p. 630-637, 2002.
 20. CLEMENTINO, M.M.; FILIPPIS, I.; NASCIMENTO, C.R.; BRANQUINHO, R.; ROCHA, C.L.; MARTINS, O. PCR analysis of tRNA intergenic spacer, 16S-23S internal transcribed spacer, and randomly amplified polymorphic DNA reveal inter- and intraspecific relationships of *Enterobacter cloacae* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.3865-3870, 2001.
 21. COQUE, T. M.; OLIVER, A.; PÉREZ-DÍAZ, J.C.; BAQUERO, F.; CANTÓN, R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.500-510, 2002.
 22. DAFFONCHIO, D.; BORIN, S.; GIUSEPPE, F.; MANACHINI, P.L.; SORLINI, C. PCR

- fingerprinting of whole genome: the spacers between the 16S and 23S rRNA genes and of intergenic tRNA gene regions reveal a different intraspecific genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.107-116, 1998.
23. DE GHELDRE, Y.; VANDAMME, P.; GOOSES, H.; STRUELENS, M.J. Identification of clinically relevant viridans streptococci by analysis of transfer DNA intergenic spacer length polymorphism. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.1591-1598, 1999.
24. DEGUCHI, T.; YASUDA, M.; KAWAMURA, T.; NAKANO, M.; OZEKI, S.; KANEMATSU, E.; NISHINO, Y.; KAWADA, Y. Improved antimicrobial activity of DU-6859a, a new fluoroquinolone, against quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* isolates with alterations in GyrA and ParC proteins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 2544-2546, 1997.
25. DESHPANDE, L.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N. In vitro activity of ceftiofur tested against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* including extended-spectrum beta-lactamase producing strains. **Internacional Journal of Antimicrobial Agents**, v. 15, p. 271-275, 2000.
26. DRANCOURT, M.; BOLLET, C.; CARTA, A.; ROUSSELIER, P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov., *Raoultella planticola* comb. nov. **International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.925-932, 2001.
27. DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 4311-4315, 2005.
28. EHRENSTEIN, B.; BERNARDS, A.T.; DIJKSHOORN, L.; GERNER-SMIDT, P.; TOWNER, K.J.; BOUVET, P.J.; DASCHNER, F.D.; GRUNDMANN, H. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.2414-2420, 1996.
29. ELTAHAWY, A.T. Gram-negative bacilli isolated from patients in intensive care unit: prevalence and antibiotic susceptibility. **Journal of Chemotherapy**, v.9, p.403-410, 1997.
30. FARMER, J. J.; DAVIS, III. B. R.; HICKMAN-BRENNER, F. W.; MCWHORTER, A.; HUNTLEY-CARTER, G. P.; ASBURY, M. A.; RIDDLE, C.; WATHEN-GRADY, H. G.; ELIAS, C.; FANNING, G. R.; STEIGERWALT, A. G.; O'HARA, C. M.; MORRIS, G. K.; SMITH, P. B.; BRENNER, D. J. Biochemical identification of new species and biotypes of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, p. 46-76, 1985.
31. FEVRE, C.; PASSET, V.; WEILL, F. X.; GRIMONT, P. A. D.; BRISSE, S. Variants of the *Klebsiella pneumoniae* OKP chromosomal beta-lactamase are divided into two main groups, OKP-A and OKP-B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p.

5149-5152, 2005.

32. GARCÍA SAN MIGUEL, L.; COBO, J.; VALVERDE, A.; COQUE, T. M.; DIZ, S.; GRILL, F.; CANTÓN, R. Clinical variables associated with the isolation of *Klebsiella pneumoniae* expressing different extended-spectrum beta-lactamases. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, p. 532-538, 2007.
33. GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F. rRNA gene restriction pattern determination (ribotyping) and computer interpretation. p. 107–133, 2001. In L. Dijkshoorn, K. J. Towner, and M. J. Struelens (ed.), **New approaches for the generation and analysis of microbial typing data**. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
34. HACEK, D. M.; SURIANO, T.; NOSKIN, G. A.; KRUSZYNSKI, J.; REISBERG, B.; PETERSON, L. R. Medical and economic benefit of a comprehensive infection control program that includes routine determination of microbial clonality. **American journal of Clinical Pathology**, v. 111, p. 647-654, 1999.
35. HAEGGMAN, S.; LÖFDAHL, S.; PAAUW, A.; VERHOEF, J.; BRISSE, B. Diversity and evolution of the class a chromosomal beta-lactamase gene in *klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, no. 7, p. 2400–2408, 2004.
36. IKONOMIDIS, A.; TOKATLIDOU, D.; KRISTO, I.; SOFIANOU, D.; TSAKRIS, A.; MANTZANA, P.; POURNARAS, S.; MANIATIS, A. N. Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a blaVIM-1 metallo-β-lactamase gene. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 43, p. 5344-5347, 2005.
37. JAWETS, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A.; BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N. (Eds.) **Microbiologia Médica**. 18. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
38. JONAS, D.; SPITZMÜLLER, B.; DASCHNER, F.D.; VERHOEF, J.; BRISSE, S. Discrimination of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* phylogenetic groups and other *Klebsiella* species by use of AFLP. **Res. Microbiol**, v. 155, p. 17–23, 2004.
39. KIFFER, C.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C.; SAMPAIO, J.; SAKAGAMI, E.; TURNER, C.M.; MYSTIC BRAZIL GROUP. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian Hospitals: The MYSTIC Program Brazil 2003. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.9, p.216-224, 2005.
40. KOB, T.H.; SNG, L.H.; BABINI, G.S.; WOODFORD, N.; LIVERMORE, D.M.; HALL, L.M.C. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Singapore producing IMP-1 beta-lactamase and lacking an outer membrane protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1939-1940, 2001.
41. KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDRA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico Microbiol gico: Texto e Atlas Colorido**. 5. Ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica, 2001. 1465p.
42. LINCOPAN, N.; MCCULLOCH J.A.; REINERT, C.; CASSETTARI, V.C.; GALES, A.C.; MAMIZUKA, E.M. First isolation of metallo-β-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**,

- v.43, p.516-519, 2005.
43. LIU, Y.; MEE, B. J.; MULGRAVE, L. Identification of clinical isolates of indole-positive *Klebsiella* spp., including *Klebsiella planticola*, and a genetic and molecular analyses of their beta-lactamases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2365-2369, 1997.
 44. LIVERMORE, D. M. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p.557-584, 1995.
 45. LOPES, A.C.S.; RODRIGUES, J.F.; CLEMENTINO, M.B.M.; MIRANDA, C.A.C.; NASCIMENTO, A.P.A.; MORAIS JÚNIOR, M.A. Application of PCR ribotyping and tDNA-PCR for *Klebsiella pneumoniae* identification. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.7, *in press*, 2007.
 46. MAES, N.; DE GHELDRE, Y.; DE RYCK, R.; VANECHOUTTE, M.; MEUGNIER, H.; ETIENNE, J.; STRUELENS, M.J. Rapid and accurate identification of *Staphylococcus* species by tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.2477-2481, 1997.
 47. MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Laboratory Press, 1982. p.368-369.
 48. MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, L.; ROSENBLUETH, M.; SILVA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **International Microbiology**, v. 7, n° 4, p.261-268, 2004.
 49. MOLAND, E.S.; HANSON, N.D.; HERRERA, V.L.; BLACK, J.A.; LOCKHART, T.J.; HOSSAIN, A.; JOHNSON, J.A.; GOERING, R.V.; THOMSON, K.S. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.51, p.711-714, 2003.
 50. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; 6th ed. M2A6. **National Committee for Clinical laboratory Standards**, Wayne, Pa. 1997.
 51. NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. **Clinical Microbiology and Infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases**, v. 8, p. 321-331, 2002.
 52. OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1661-1669, 1999.
 53. ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F. Serotyping of *Klebsiella pneumoniae*. **Methods in Microbiology**, v.14, p.143-164, 1984.
 54. PATERSON, D. L.; HUJER, K. M.; HUJER, A. M.; YEISER, B.; BONOMO, M. D.; RICE, L. B.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of

- SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. **Antimicrobials Agents Chemotherapy**, v. 47, p. 3554-3560, 2003.
55. PFALLER, M. A.; ACAR, J.; JONES, R. N.; VERHOEF, J.; TURNIDGE, J.; SADER, H. S. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32(suppl2), p. S156-167, 2001.
56. PODSCHUM, R.; ULLMANN, U. Isolation of *Klebsiella terrigena* from clinical specimens. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.11, p. 349-352, 1992.
57. PODSCHUM, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.589-603, 1998.
58. POIREL, L.; HÉRITIER, C.; TOLÜN, V.; NORDMANN, P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 15-22, 2004.
59. ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ, L.; SILVA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant associated isolates. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 27-35, 2004.
60. SADER, H. S.; PIGNATARI, A.C.; LEME, I. L.; BURATTINI, M. N.; TANCRESI, R.; HOLLIS, R. J.; JONES, R. N. Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, p. 13-18, 1993.
61. SADER, H.S.; PFALLER, M. A.; HOLLIS, R. J. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of hospital infectious. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 15, p. 407-431, 1995.
62. SOUZA LOPES, A. C.; RODRIGUES, J. F.; MORAIS JÚNIOR, M. A. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. **Microbiological Research**, v.160, p. 37-46, 2005.
63. STOCK, J.; WIEDEMANN, B. Natural antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* and *K. terrigena* strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 396-406, 2001.
64. TOSIN, I.; SILBERT, S.; SADER, H. S. The use of molecular typing to evaluate the dissemination of antimicrobial resistance among gram-negative rods in Brazilian hospitals. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, no. 6, p. 360-369, 2003.
65. TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. (Eds.) **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 586 p.
66. VAN DER ZEE, A.; STEER, N.; THIJSSSEN, E.; NELSON, J.; VAN'T VEEN, A.; BUITING, A.

Use of multienzyme multiplex PCR amplified fragment length polymorphism typing in analysis of outbreaks of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 798–802,2003.

67. VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology Reviews**, v.60, p.407-438, 1996.
68. VANEECHOUTTE, M.; BOERLIN, P.; TICHY, H.V.; BANNERMAN, E.; JÄGER, B.; BILLE, J. Comparison of PCR-based DNA fingerprinting techniques for the identification of *Listeria* species and their use for atypical *Listeria* isolates. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.127-139, 1998.
69. VERCAUTEREN, E.; DESCHEEMAEKER, P.; IEVEN, M.; SANDERS, C.C.; GOOSSENS, H. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum β -lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2191-2197, 1997.
70. WELSH, J.; MCCLELLAND, M. PCR-amplified length polymorphisms in tRNA intergenic spacers for categorizing staphylococci. **Molecular Microbiology**, v.6, p.1673-1680, 1992.
71. WOODFORD, N.; TIerno, P.M.; YOUNG, K. Et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.4793-4799, 2004.

9. ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto Pesquisa: “Estudo comparativo de isolados patogênicos e não-patogênicos de *Klebsiella pneumoniae* através de métodos moleculares e fenotípicos”.

Pesquisadora Responsável: Prof^a Dr^a Ana Catarina de Souza Lopes. Fone: 2126.8526

Endereço Res.: R. Zezito Costa Rego, 51/303. Cidade Universitária. Recife-PE. 50740-010

Eu, pai ou mãe ou responsável, _____ fui esclarecido do Projeto “Estudo comparativo de isolados patogênicos e não-patogênicos de *Klebsiella pneumoniae* através de métodos moleculares e fenotípicos”, que tem como objetivo estudar uma bactéria chamada *Klebsiella*, que pode estar presente normalmente na garganta, no nariz ou nas fezes, apenas causando doença se a criança estiver fraca ou debilitada, permitindo que colete fezes (em frascos) e um pouco da secreção da garganta e nariz do meu filho (a), com um “swab” (tipo cotonete) estéril. Também fui esclarecido que o risco dessa pesquisa para criança é um desconforto no momento da coleta da secreção da garganta e nariz com o “swab” (tipo cotonete). Os benefícios deste trabalho de pesquisa será o estudo desta bactéria, fornecendo dados para o controle da *Klebsiella*, evitando que ela cause infecções. Fui ainda informado que a identidade do meu filho (a) terá garantia de sigilo e privacidade. Comprometo-me que meu filho (a) irá participar da pesquisa, porém como voluntário, poderei retirá-lo (a) a qualquer momento que desejar.

Recife, ____ de _____ de _____.

Assinatura do pai ou responsável: _____

Pesquisadora Responsável: _____

1^a Testemunha: _____

2^a Testemunha: _____

Criança: _____

Escola: _____

Idade: _____ Endereço: _____

ANEXO 2

FEMS MICROBIOLOGY LETTERS TOPAUTHOR GUIDELINES

Published on behalf of the Federation of European Microbiological Societies

Edited by: Jeff Cole

Print ISSN: 0378-1097

Online ISSN: 1574-6968

Frequency: Bi-monthly

Current Volume: 278 / 2008

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2007: 48/94 (Microbiology)

Impact Factor: 2.274

FEMS publishes five journals in the area of microbiology. All five journals follow the same instructions for manuscript preparation. If one journal has a different procedure, this will be mentioned at the appropriate place.

EDITORIAL POLICY

All submitted papers should be complete in themselves and adequately supported by experimental detail; they should not be preliminary versions of communications to be published elsewhere. Descriptions of new methods are acceptable, and the Editors welcome papers that put forward new hypotheses. However, papers that provide confirmatory evidence or merely extend observations firmly established in one species or field site to another will not be accepted unless there are strong reasons for doing so. Members of the Editorial Boards and other appropriate experts will referee the papers. Editors handling papers will independently make decisions on acceptance, revision or rejection based on the referees' reports. The Chief Editors or Editors will usually reject papers outside the scope of the journal with an immediate decision. Authors who feel that there are substantial grounds for disagreement with an Editor's decision should contact the Chief Editor, whose decision will be final. Authors who wish to withdraw their manuscript (at any stage of the process) should contact their Editor.

AIMS AND SCOPE

FEMS Microbiology Letters

The Editors give priority to concise papers that merit urgent publication by virtue of their originality, general interest and their contribution to new developments in microbiology. All aspects of microbiology, except virology (other than bacteriophages), are covered. Areas of special interest include: molecular biology and genetics; genomics; microbial biochemistry and physiology; structure and development; pathogenicity; medical and veterinary microbiology; environmental microbiology; applied microbiology and microbial biotechnology; systematics and bioinformatics. Papers (Research Letters and MiniReviews)

can deal with any type of microorganism: bacteria and bacteriophage, yeasts, filamentous fungi and protozoa, cyanobacteria and eukaryotic algae.

MiniReviews are normally invited, but prospective authors are encouraged to contact the listed Editors to discuss possible contributions:

a) For *FEMS Microbiology Letters*: Ian Henderson, Simon Silver or Derek Sullivan.

LETTERS TO THE EDITOR AND SHORT COMMUNICATIONS

Letters to the Editor are brief communications focusing on an article that has been published in the journal within the previous six months. They should focus on some aspect(s) of the paper that is, in the author's opinion, incorrectly stated or interpreted, controversial, misleading or in some other way worthy of comment. All Letters to the Editor must address a scientific issue in an objective fashion, should be fewer than 1000 words, and will be externally refereed. If acceptable for publication, they will be offered to the original authors for comment. Short Communications (not applicable to *FEMS Microbiology Letters*) are similar to a short paper but without the limitations of subdivisions into Introductions, Methods, etc. They should include the title page and the abstract and not exceed 1600 words. References should be kept to a minimum, one table or illustration is acceptable. Please choose the manuscript type 'Letter to the Editor' or 'Other' when uploading through the online submission system.

SUBMISSION PROCEDURES

All FEMS journals

Manuscripts should be submitted through Manuscript Central@ <http://mc.manuscriptcentral.com/fems>. Instructions for the submission procedure can be found under 'FEMS Submission Instructions', reached via the 'Instructions and Forms' button at the top right of all Manuscript Central pages.

Such proposals should contain:

- a) an outline (1-3 pages);
- b) a short statement describing the aim, scope and relevance of the review, and an indication of why the review is timely;
- c) information on whether there has been any review covering this or a related field in the past few years, and, if so, the specific importance of the proposed review;
- d) a statement as to when the completed review might be expected;

- e) full contact details of four experts in the field who are familiar with the topic;
- f) a list of recent key references showing the contributions to the field made by the author(s).

The proposals will be evaluated and authors may be invited to submit the review, if the material is satisfactory and of general interest.

Revision

Manuscripts may be returned to authors for modification of the scientific content and/or for shortening and language corrections. Revised versions must be submitted online through Manuscript Central. You will need to go to the list "Manuscripts with Decisions" (under My Manuscripts) and from there you need to click "create a revision" at the right-hand side (under Actions). At this stage, we require a source file of your text and tables (.doc or .rtf format, but not .pdf). You must clearly indicate in the designated place and/or cover letter the changes that have been made. Figures should be uploaded in separate files and at sufficient resolution (see section on Preparation of data). All obsolete files of the previous version should be deleted from the revised submission. If a paper that is returned to the authors for amendment is not resubmitted in revised form within one month (*FEMS Microbiology Letters*) or two months (other journals) it will be regarded as withdrawn. Any revised version received subsequently will be treated as a newly submitted manuscript and the date of receipt will be altered accordingly.

PREPARATION OF MANUSCRIPTS

Language

Manuscripts should be in English (consistent with either British or American spelling). Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscripts checked by someone proficient in the language. You are strongly advised to ensure that the English is of a publishable standard prior to submission. Manuscripts that are deficient in this respect may be returned to the author without peer review.

Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Layout of manuscripts

FEMS strongly recommends that you compile your manuscript in MS Word and save it as a .doc file, using the following layout.

- a) Title page, followed by the abstract, main text in one single column and references.
- b) Tables, each on a separate page.
- c) Figure legends.
- d) Figures, putting each figure on a separate page and ensuring that the figure is at least the size it will be in the printed document. Include the figure number (e.g. Fig. 1) and legend well outside the boundary of the space occupied by the figure. If you wish to upload separate figure files, Manuscript Central will combine your manuscript main body and figure files into one online .pdf file. Please ensure that you upload the figures only once, i.e. either embedded at the end of the text document or as separate files.
- e) Include page and line numbering (continuous).
- f) The right-hand margin justification should be switched off. Artificial word breaks at the end of lines must be avoided.
- g) If you do not use MS Word then save in MS Word format in the word processor that you use. Rich text (.rtf) format may also be used.
- h) Use standard fonts (Arial, Times New Roman, Symbol, Helvetica, Times). In your Word document, on the Tools menu, click Options, select the Embed TrueType fonts check box and then click the Save tab.

Length

One journal page is about three manuscript pages, each table is about 0.3 of a printed page and each figure is about 0.25 of a printed page.

FEMS Microbiology Letters

Priority will be given to short papers. The majority of papers will occupy only four to six pages of the journal. The text (including abstract but excluding the title page, references in text and as list, and figure legends) should not exceed 3000 words. References should be kept to a minimum and a combined total of six figures and tables are permitted. If the paper exceeds these guidelines, the manuscript will be returned for condensation without review unless the authors have provided compelling reasons for the exceptional length.

Title, authors, keywords and running title

The manuscript should not form part of a numbered series but should be headed by a concise, informative title. Authors are reminded that titles are widely used in information-retrieval

systems. The title should be followed by the name(s) of the author(s) (with first or middle names in full and including all initials) and by the name(s) and address(es) of the institute(s) where the work was performed. For multiple authors with different affiliations, please indicate the relevant affiliations. The name, full postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address of one corresponding author should be provided in a footnote. FEMS journals have one corresponding author. Shared or equal contribution of authors should be mentioned at the end of the article. A list of three to six keywords must be included on the first page. Authors are requested to consult the subject indices of the individual journals or the list of subject headings from Index Medicus for preferred synonyms and standard abbreviations. Plural terms should be avoided. The title is not used for preparing the index, so important words and phrases may appear in both the title and keywords. General terms, such as 'Enzyme', 'Membrane', 'Transport', etc., should not be used unless qualified, e.g. 'Enzyme activation', 'Membrane phosphorylation', 'Ion transport'.

Please supply a short running title of up to 60 characters (including spaces).

General organisation of manuscripts

Materials and methods and *Results* are normally written in the past tense and the present tense is occasionally used in the *Introduction* and *Discussion*.

a) *Abstract*. This should be a single paragraph of fewer than 200 words and must be intelligible without reference to the full paper. Ideally, references are not cited.

b) Abbreviations should be avoided, but if necessary, they must be defined the first time they are used in the main text. Do not abbreviate genus in the title, keywords, or at first use in the Abstract and Introduction.

c) *Introduction*. This should state the aims and objectives, but should not contain a summary of the results.

d) *Materials and methods*. Sufficient detail must be provided to allow the work to be repeated. Suppliers of materials and a brief address should be mentioned if this might affect the results.

e) *Results* (the presentation of data is described below).

f) *Discussion*. This should not simply recapitulate the *Results*. Combined *Results and Discussion* sections are encouraged when appropriate.

g) *Acknowledgements* can be made to funding agencies, colleagues who assisted with the work or the preparation of the manuscript, and those who contributed materials or provided unpublished data.

h) *References*.

Preparation of Supporting Information

Electronic Supporting Information may be provided to support and enhance your manuscript with, e.g. supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets or sound clips. Supporting files will be published, subject to editorial approval, online alongside the electronic version of your article. Authors should submit the Supporting Information at the same time as the manuscript, but in separate file(s). Select 'Supplemental files', 'Supporting Document' or 'MultiMedia' for the file designation when uploading through the online submission system. Upload a separate .doc file listing concise and descriptive captions for each file uploaded as Supporting Information. Please indicate that you have uploaded these files in your cover letter and state clearly whether they are intended for eventual online publication as Supporting Information, or are for peer review purposes only.

Presentation of data

Do not tabulate or illustrate points that can be adequately and concisely described in the text. Do not repeat information in both tables and figures. Figures and tables, along with their legend (and/or footnote), should be understandable in their own right without having to refer to the main text. Tables should be supplied in Word or Excel format, and must be editable (not pasted in as a picture).

(a) *Tables*. Explanatory footnotes should be related to the legend or table using superscript, lower-case letters. All abbreviations should be defined after the footnotes below the table.

(b) *Line art*.

- Figures should be supplied at twice their final size with wide margins.

- A single column figure is 80 mm, two-thirds page width is 114mm and two-column width is 168 mm.

- All lines should be drawn at 1.5 point (0.5 mm wide), broken line styles may be used to differentiate multiple plot lines if desired.

- Letters and numbers should be 16 point (capitals 4mm high) non-serif.

- Symbols in the figure itself should be 3mm in diameter. Lines drawn to accompany the points should not go through hollow symbols.

- Grid lines should not be used.

- Numbers used as axis labels should have minimum significant figures; amounts less than unity must carry a preceding zero (e.g. 0.5 not .5).

- Larger composite figures may be designed to occupy two columns when this can achieve an overall saving in space. The character, line and symbol sizes should be adjusted accordingly to achieve the same sizes on the printed page.

(c) *Half-tone and colour figures*. Magnification should be indicated where appropriate by inclusion of a bar marker. Photographs of electropherograms, etc., in which there is poor contrast may be better replaced by line drawings, but in this case the photographs should be

submitted for scrutiny by the Editor. If photographs have been digitally processed to enhance their quality, this should be stated. **Colour illustrations will be published free of charge provided that the colour is deemed essential for interpretation of the figure.** Please note that colour figures will appear in colour in the online article, regardless of whether colour was deemed essential for the print copy. Suggestions for cover illustrations for the journal are also welcome.

(d) *Electronic submission of figures.* High-quality figures are required when the final version of the manuscript is uploaded through Manuscript Central, and should be prepared using the following guidelines.

- Please use high-quality graphics programs such as Adobe Photoshop or Adobe Illustrator.
- Figures should be at the desired size for the printed article, i.e. 80mm wide for single column, 114mm for two-thirds page width and 168mm for double column.
- For halftones, the resolution should be a minimum of 300 dpi; combination artwork at a minimum of 500 dpi; and for line figures preferably 1000 to 1200 dpi.
- Combination artwork (artwork containing half-tone and line art elements, e.g. electrophoresis gels or Southern blots with lane and fragment sizes labeled) must be in EPS. If the combination artwork is scanned, the preferred format is .tif with a resolution of at least 500 dpi using LZW compression.
- Colour artwork should be saved as CMYK, not RGB.
- The following figure formats are acceptable (as long as they are created with the instructions given above):
 - .tif and .eps (please be sure to embed all fonts used)
 - Illustrator (.ai) or Photoshop files (.psd)
 - One file must be submitted for each figure.
 - Save files with LZW compression.

You will find further helpful and simplified guidelines by clicking the 'Preferred FEMS format for revised manuscripts' icon, reached via the 'Instructions and Forms' button at the top right of all Manuscript Central pages. Detailed information can be found at <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>. In principle, the electronic files will be used for producing the final publication, but the Publisher may request a set of highquality printouts of your figures for production purposes.

(e) *Figure legends.* Legends should consist of a preliminary sentence constituting a title, followed by a brief description of the way the particular experiment was carried out, and any other necessary description of symbols or lines. All abbreviations must be defined.

Reproducibility of results and statistical tests (except for *FEMS Microbiology Reviews*)

Authors should state how many times experiments were repeated and whether mean or representative results are shown. Variability should be indicated statistically wherever possible as part of, but not in place of, a proper statistical analysis. If results are expressed as percentages, the absolute value corresponding to 100% must be stated. Avoid values with unjustified numbers of significant figures; in most cases three significant figures is consistent with the accuracy attained in microbiological experiments.

Results of statistical tests should be presented wherever possible as evidence for conclusions reached. Such information must be presented concisely to illuminate the results, but not to dominate them. The tests used should be briefly described in the Materials and methods section. Details of the diagnostic checks made for the assumptions of the statistical tests and for the validity of any transformations used should be stated clearly. Further information can be found in the following references: (a) Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1981) *Biometry*. W.H. Freeman, San Francisco; (b) Fry, J.C. (1993) *Biological Data Analysis: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.

Nomenclature, abbreviations and units

Authors should follow internationally accepted rules and conventions. Authors should provide evidence for the thorough identification of new isolates and use the most recent acceptable name.

Prokaryotes. The spelling of bacterial names should follow the list of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature <http://www.bacterio.cict.fr/>. If there is a reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the name should be printed in roman type and enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example, see *Int. J. Syst. Bacteriol.* (1980) 30: 547-556).

Fungi. The authors should use recently accepted binomials controlled by the International Code of Botanical Nomenclature (<http://www.bgbm.fu-berlin.de/iapt/nomenclature/code/SaintLouis/0000St.Luistitle.htm>). Scientific names of yeasts can be found in: *The Yeasts: a Taxonomic Study*, 4th ed. (C. P. Kurtzman and J.W. Fell, ed., Elsevier B.V., Amsterdam, The Netherlands, 1998). Taxonomic texts should cite nomenclatural authorities at the first time a name is mentioned. For abbreviation of authors' names, see <http://www.indexfungorum.org/AuthorsOfFungalNames.htm>. All bacterial taxa should be italicized.

Viruses. Names used for viruses should be those approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>. If desired, synonyms may be added parenthetically when the name is first mentioned. Approved generic (or group) and family names may also be used.

Enzymes. For enzymes, use the recommended (trivial) name assigned by the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology as described in Enzyme Nomenclature <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> enzyme/.

Genes. Genetic nomenclature should essentially follow the recommendations of Demerec *et al.* (*Genetics* (1966) 54: 61-76), and those given in the instructions to authors of the *Journal*

of *Bacteriology* and *Molecular and Cellular Biology* (January issues). Biochemical compounds. Consult the *European Journal of Biochemistry* or the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/>).

Abbreviations. Abbreviations should only be used as an aid to the reader and their use should be strictly limited. Define each abbreviation and introduce it in parentheses the first time it is used: e.g. 'cultures were grown in Eagle minimal essential medium (MEM)'. Eliminate abbreviations that are not used at least six times in the manuscript. In addition to abbreviations to the international system of units of measurements, other common units (e.g., bp, kb, Da), chemical symbols for the elements, and the standard biochemical abbreviations (see *Eur. J. Biochem.*) should be used without definition. Standard chemical symbols and trivial names or their symbols (folate, Ala, Leu, etc.) may be used for terms that appear in full in the neighbouring text. Abbreviations other than those recommended by the IUPAC-IUB (Biochemical Nomenclature and related Documents, 1978) should be used only when a case can be made for necessity, such as in tables and figures. A short guide on the use of common abbreviations can be found on the Author page on the FEMS website (<http://www.fems-microbiology.org/website/nl/page125.asp>).

Reporting numerical data. The international system of units (SI) should be used; mL is acceptable in place of cm³ for liquid measures. The form for units is mg mL⁻¹ and not mg/mL, parentheses should be used to improve clarity, e.g. mL (g drywt soil)⁻¹ h⁻¹. The prefixes k, m, m, n, and p should be used in combination with the standard units for reporting length, weight, volume and molarity for 10³, 10⁻⁶, 10⁻⁹, and 10⁻¹², respectively. Use mg mL⁻¹ or mg g⁻¹ instead of the ambiguous ppm. Units of temperature are presented as follows: 37  C or 324 K.

References

Reference citations in the text follow the name and date system. References should be inserted in parentheses in date order, as follows: (Brown, 1996; Brown & Smith, 1997; Smith et al., 1998). The reference list itself must be in alphabetical order according to the first-named author, then by number of authors, then chronologically within the one-author group, alphabetically within the two-author group and chronologically within the three or more author group. The title of the article must be included. For papers with ten or fewer authors, all authors must be listed. For papers with eleven or more authors, the first three names should be listed, followed by 'et al.'. Standard abbreviations of journal titles should be used, as in the Index Medicus. The following formats should be followed:

O'Donnell CM & Edwards C (1992) Nitrosating activity in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 95: 87-94.

Dinter Z & van Morein B (1990) *Virus Infections in Ruminants*. Elsevier, Amsterdam.

McCarthy AJ (1989) Thermomonospora. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4* (Williams ST, Sharpe ME & Holt JG, eds), pp. 2552-2572. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

Tang CR (2001) Cloning of a new ice nucleation active gene for insect pest control. PhD Thesis, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing.

Reference should not be made to work 'in press' unless it has been accepted for publication; a DOI number should then be provided. Unpublished results and personal communications may be mentioned within the text itself provided that (a) the names and initials of all the persons involved are listed, and (b) they have all granted permission for the citation. In the case of an online journal publication the DOI number of the reference should be used.

Nucleotide and amino acid sequences

Any new nucleotide or amino acid sequences must be deposited in an appropriate data bank. Authors are encouraged to use the EMBL Data Library but can also use other archives, such as GenBank. **An accession number must be obtained before submission to the Editors and this fact should be mentioned in the covering letter.** Authors should include the accession number in the appropriate figure legend. Authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised (e.g. GenBank accession nos. **AI631510, AI631511, AI632198** and **BF223228**). Authors are advised to check accession numbers very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

COPYRIGHT AND ONLINEOPEN

Upon acceptance of an article, the corresponding author should sign either a Copyright Assignment form or OnlineOpen form. OnlineOpen is a pay-to-publish service from Wiley-Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via the Wiley InterScience website. Each OnlineOpen article will be subject to a one-off fee to be met by or on behalf of the Author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. The print version of the article will also be branded as OnlineOpen and will draw attention to the fact that the paper can be downloaded for free via the Wiley InterScience service. Any authors wishing to use the OnlineOpen service will be required to complete the relevant combined payment and copyright licence form available from the links at the end of these notes.

Once complete the Copyright assignment form or OnlineOpen form should be sent to the Editorial Office along with the rest of the manuscript materials as soon as possible after the acceptance. Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen.

The copyright statement for OnlineOpen authors will read:

 [date] The Author(s) Journal compilation

 [date] Federation of European Microbiological Societies. Published by Blackwell Publishing Ltd

PROOFS AND AUTHOR SERVICES

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

When proofs have been produced, the corresponding author will receive an e-mail alert from the Publisher containing a link to a web site. It is therefore essential that the e-mail address of the corresponding author is working and current. The proof can be downloaded as a PDF file from this site Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. This will enable the file to be opened, read on screen or printed out. Further instructions will be sent with the proof regarding how to indicate and communicate any changes to the Publisher. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Queries will be addressed to the corresponding author. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, may be charged for separately. The Editors reserve the right to make minor alterations to the text without altering the scientific content.

For *FEMS Microbiology Letters*, the Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated within three days.

OFFPRINTS

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal.

ETHICAL AND RELATED ASPECTS

The Editors expect that new and variant organisms, viruses and vectors described in FEMS journals will be made available, under written request and for their own use, to all qualified members of the scientific community. If delays in strain or vector distribution are anticipated or if they are available from sources other than the authors, this should be indicated. The Editors encourage authors to deposit important strains in publicly accessible culture collections and to refer to the collections and strain numbers in the text. In the case of materials that have been distributed by individuals, authors should indicate the laboratory strain designations and name and address of the donor as well as the original culture collection identification number, if any.

Papers describing experimental work with humans must include a statement that the Ethical Committee of the institution in which the work was done has approved it, and that the subjects gave informed consent to the work. Experiments with animals or with genetically manipulated organisms must have been undertaken in accordance with the legal requirements of the relevant local or national authority. Procedures must be such that experimental animals do not suffer unnecessarily. Submission of a manuscript implies that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, review or academic thesis, in which case reference should be made in a footnote to the title) and that it is not under consideration for publication elsewhere. **The corresponding author must ensure that its publication has been approved by all co-authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out and that all persons entitled to authorship have been named.** If accepted, the article must not be published elsewhere in the same form in either the same or another language, without the consent of the Editor and Publisher. Each named author must be responsible for at least the part describing his or her contribution and must have seen the entire final text before submission and any substantial subsequent revisions. Authorship should be dealt with carefully and all authors should agree with it at the submission stage. FEMS journals do not permit adding or removing of authors or rearranging their order after acceptance. The Editors must be notified in writing by the corresponding author of any deviation from these rules. Should any author become aware of a breach of ethics he/she should contact the Chief Editor of the journal who will endeavour to retract the article. Articles published in FEMS journals represent the scientific findings and opinions of the authors. Whilst the Editors and Publisher make every effort to ensure the accuracy of all published matter, they can accept no responsibility or liability, collectively or individually, for any erroneous, misleading or unintentionally damaging statements, which may appear in the journal. Authors must draw attention in the Materials and methods to any chemical or biological hazards that may be involved in the experiments described.

PERMISSION TO REPRODUCE MATERIAL

Individuals wishing to reproduce material (not exceeding 250 words of text) from articles published in FEMS journals for non-commercial purposes may do so providing the original publication is acknowledged accordingly and the authors' approval is obtained, and in this case no special permission is needed from the Publisher. Authors may also include the article in a thesis without special permission. In all other cases, permissions may be sought directly from the Journal Rights Department: e-mail journalsrights@wiley.com.

QUICK LINKS

- Manuscript submission: <http://mc.manuscriptcentral.com/fems>; and instructions can be reached via the 'Instructions and Forms' button at the top right of all Manuscript Central pages
- FEMS journals: <http://www.fems-microbiology.org>
- Editorial Office: e-mail admin.journals@fems-microbiology.org
- Production Office: e-mail fems@wiley.com
- Electronic Graphics: <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>
- Copyright assignment forms (CAF) and OnlineOpen forms (OOF):

FEMS Microbiology Letters:

CAF: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/FEMSLE_CAF.pdf

OOF: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/FEMSLE_OOF.pdf

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)