



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

**DETERMINAÇÃO DA AÇÃO *IN VITRO* DE ANTIBIÓTICOS
B-LACTÂMICOS FRENTE ISOLADOS MULTIDROGA-
RESISTENTES DE *Klebsiella pneumoniae* PORTADORES
DOS GENES *bla*_{KPC}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} ou *bla*_{CTX-M}**

DYANA LEAL VERAS

Recife/PE

2014

DYANA LEAL VERAS



DETERMINAÇÃO DA AÇÃO *IN VITRO* DE ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS FRENTE ISOLADOS MULTIDROGA-RESISTENTES DE *Klebsiella pneumoniae* PORTADORES DOS GENES *bla*_{KPC}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}

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

Orientador: Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Alves

Fevereiro, 2014

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

- V476d Veras, Dyana Leal.
Determinação da ação *in vitro* de antibióticos β -Lactâmicos frente isolados multidroga-resistentes de *klebsiella pneumoniae* portadores dos genes *bla_{KPC}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}* / Dyana Leal Veras. – Recife : O autor, 2014.
191 f. : il. ; tab. ; 30 cm.
- Orientador: Fábio André Brayner dos Santos.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2014.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Beta-lactâmicos. 3. Beta-lactamases. I. Santos, Fábio André Brayner dos (Orientador). II. Título.
- 618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-108)



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

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

DYANA LEAL VERAS

No dia 24 de Fevereiro de 2014, às 09h30, no Auditório Murillo La Greca do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFPE), os Membros Doutores: a Prof^ª. Dr^ª. Ana Catarina de Souza Lopes (UFPE) – Presidente da Banca, o Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (UFRPE), a Prof^ª. Dr^ª. Danyelly Bruneska Gondim Martins (LIKA/UFPE), a Prof^ª. Dr^ª. Valéria Wanderley Teixeira (UFRPE) e o Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano (UNESP), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguiram a doutoranda DYANA LEAL VERAS sobre a sua Tese intitulada “Determinação da ação in vitro de antibióticos β -lactâmicos frente isolados de *Klebsiella pneumoniae* portadores dos genes blaKPC, blaSHV, blaTEM ou blaCTX-M”, a qual foi orientada pelo Prof. Dr. Fábio Brayner dos Santos (UFPE) e co-orientada pelo Prof. Dr. Luiz Carlos Alves (CPqAM/FIOCRUZ). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof^ª. Dr^ª. Ana Catarina de Souza Lopes

APROVADA

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

APROVADA

Prof^ª. Dr^ª. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Aprovada

Prof^ª. Dr^ª. Valéria Wanderley Teixeira

APROVADA

Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano

APROVADA

Prof^ª. Dr^ª. Ana Catarina de Souza Lopes

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Prof^ª. Dr^ª. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Prof^ª. Dr^ª. Valéria Wanderley Teixeira

Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano

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

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

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

Valdênia Maria Oliveira de Souza

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

Vera Magalhães da Silveira

CORPO DOCENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Celina Maria Turchi Martelli

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Rejane Pereira Neves

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

DEDICO,

*Ao meu filho Matheus e esposo
Guilherme. Mesmo diante de qualquer
distancia ou dificuldade, estivemos e sempre
estaremos juntos.*

Aos meus pais e irmãos.

Aos meus orientadores e amigos.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente à Deus, pelo que sou e por todas as graças concedidas;
- Aos meus amados, Guilherme e Matheus. Vocês são sobretudo meu coração. Sem vocês não existo;
- Aos meus pais Ana e Amaury pela ajuda, apoio, preocupação e a cima de tudo amor;
- À minha querida e amada irmã, Eliza, pela amizade, proteção, apoio, carinho e amor. Somos irmãos de alma;
- Aos meus amados irmãos Neto e Eliane, pelo carinho, amor e amizade;
- À minha sogra Marilene e sogro Reginaldo por todo o amor, apoio e presteza dedicado a mim e a minha família, em todos os momentos;
- Aos meus orientadores e amigos Luiz Carlos Alves e Fábio André Brayner dos Santos, por todos os momentos, ensinamentos, companheirismo e amizade;
- À Ana Paula e Carmelita, vocês são amigas que nunca esperei encontrar. Muito obrigada por todos os momentos;
- À “Prof.” Ana Catarina, pela amizade e ensinamentos em toda a minha vida acadêmica. Possui toda minha admiração;
- Aos amigos do LBCM, Grasielle, Catarina, Gabriel, Fernanda, Nairon, Everton, Alysson, Elverson, Alberon, Duda, Patrícia, Thiago, Alberon e Amanda. Obrigada pela amizade e companheirismo;
- Ao técnico do setor de Microscopia Eletrônica do LIKA/UFPE, Rafael, pela amizade, apoio e incentivo;
- À todos do Departamento de Parasitologia do CPqAM/FIOCRUZ, especialmente a Dr. Abraham Rocha, Cristiane e Josué.
- Ao Dr. Sinval Pinto Brandão, Diretor do CPqAM/FIOCRUZ;
- Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE), pela colaboração e dedicação;
- Aos funcionários do NPT/CPqAM, Cássia, Vivi, e Marlos, pela dedicação e auxílio na execução de diversas técnicas utilizadas neste estudo.
- A todos os funcionários do Departamento de Medicina Tropical – UFPE, por toda a atenção;
- Aos professores da pós-graduação, pelos ensinamentos;

- A todos que fazem o CPqAM/FIOCRUZ e LIKA/UFPE, que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho.

“O essencial é invisível aos olhos”
O pequeno príncipe
(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar a ação *in vitro* de antibióticos β -lactâmicos em isolados de *Klebsiella pneumoniae* portadores dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} ou *bla*_{CTX-M}, desenvolvendo embasamento teórico para futura proposição de novas combinações terapêuticas. Sete isolados de *K. pneumoniae* foram utilizados, sendo 3 clínicos, 2 de comunidade e 2 de microbiota. Os isolados clínicos e de comunidade são portadores de genes codificantes de ESBL ou KPC e os de microbiota de β -lactamases clássicas. Os genes de resistência foram identificados por PCR e seqüenciados utilizando primers específicos. A primeira fase deste estudo identificou os efeitos ultra-estruturais causados por β -lactâmicos *in vitro* nos isolados clínicos e de microbiota de *K. pneumoniae*. Os isolados clínicos foram submetidos a concentrações clinicamente relevantes de ceftazidima, cefotaxima, aztreonam e/ou imipenem e os isolados de microbiota a ampicilina e amoxicilina, para análise pela Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Varredura (MEV). Diferentes alterações morfológicas e ultra-estruturais foram identificadas, como filamentação celular, perda de material citoplasmático e deformação dos septos de divisão, após submissão aos antibióticos, tanto nos isolados clínicos de *K. pneumoniae* como nos obtidos de microbiota. A segunda fase deste estudo determinou a influência destes antibióticos na produção de cápsula polissacarídica (CPS) nos isolados clínicos e de comunidade de *K. pneumoniae*. Os isolados foram submetidos a concentrações clinicamente relevantes de cefotaxima, ceftazidima, aztreonam e/ou imipenem para análise pela MET, utilizando citoquímica de carboidratos. Todos os isolados tiveram confirmação da presença da região promotora do operon envolvido na produção de CPS, identificado através de PCR e sequenciamento. A ceftazidima e o aztreonam foram capazes de inibir a produção de CPS nos isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBLs mas não no isolado produtor de KPC, o qual teve sua síntese fortemente inibida apenas pelo imipenem. A cefotaxima não interferiu na produção de CPS em nenhum dos isolados analisados. Nossos resultados demonstraram que antibióticos β -lactâmicos possuem ação residual *in vitro* nos isolados analisados, sugerindo que a produção de ESBL e KPC por isolados de *K. pneumoniae* não são capazes de evitar completamente a interação de antibióticos β -lactâmicos com as PBPs bacterianas. Podemos concluir ainda que a ceftazidima, o aztreonam e o

imipenem, podem ser capazes de inibir a produção de CPS em isolados clínicos e de comunidade de *K. pneumoniae*, contribuindo para diminuir a expressão do fator de virulência mais importante desta espécie bacteriana.

Palavras chaves: *Klebsiella pneumoniae*. Beta-lactâmicos. Beta-lactamases.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the *in vitro* effect of β -lactam antibiotics on *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying the *bla*_{KPC}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes, in order to develop a theoretical basis for future proposals for new therapeutic combinations. Seven isolates of *K. pneumoniae* were used: 3 clinical, 2 from community and 2 from microbiota. Clinical and community isolates are carriers either ESBL or KPC encoding genes and, on the other hand, the microbiota isolates are carriers only of classical β -lactamase encoding genes, which were identified by PCR and sequencing. The first phase of this study identified ultrastructural effects caused *in vitro* by β -lactam antibiotics on clinical and microbiota isolates of *K. pneumoniae*. Clinical isolates were submitted to clinically relevant concentrations of ceftazidime, cefotaxime, aztreonam and/or imipenem and microbiota isolates to ampicillin and amoxicillin, for analysis by Transmission Electron Microscopy (TEM) and scanning (SEM). Distinct morphological and ultrastructural changes were observed after submission to these antibiotics, as cell filamentation, loss of cytoplasmic material and deformation of division septa, in both clinical and microbiota isolates of *K. pneumoniae*. The second phase of this study determined the influence of these antibiotics on the production of capsular polysaccharide (CPS) by clinical and community isolates of *K. pneumoniae*. The isolates were subjected to clinically relevant concentrations of cefotaxime, ceftazidime, aztreonam and/or imipenem for analysis by TEM, using cytochemistry of carbohydrates. All isolates had confirmed the presence of the promoter region of operon, involved in CPS production, which was determined by PCR and sequencing. The ceftazidime and aztreonam were able to inhibit the production of CPS in *K. pneumoniae* isolates ESBLs producing, but not in the isolate producer of KPC, which had its synthesis strongly inhibited only by imipenem. Cefotaxime did not affect the CPS production in none of the analyzed isolates. Our results demonstrate that β -lactam antibiotics had, *in vitro*, a residual effect on the analyzed isolates, supporting the idea that the KPC and ESBL production by isolates of *K. pneumoniae* are unable to completely prevent the interaction of β -lactam antibiotics with bacterial PBPs. We can also conclude that ceftazidime, aztreonam and imipenem may be able to inhibit the production of CPS in clinical and community isolates of *K. pneumoniae*, decreasing the expression of the most important virulence factor of this bacterial species.

Keywords: *Klebsiella pneumonia*. Beta-lactams. Beta-lactamases.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1 (a-e): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de transmissão do isolado K3C de <i>K. pneumoniae</i>	80
Figure 2 (a-h): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de transmissão do isolado K16R de <i>K. pneumoniae</i>	81
Figure 3 (a-h): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de transmissão do isolado K652 de <i>K. pneumoniae</i>	82
Figure 4 (a-i): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura do isolado K652.	83
Figure 5 (a-d): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura do isolado K16R.....	84
Figure 6 (a-d): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura do isolado K3C.....	85
Figure 7 (a-c): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de transmissão dos isolados K21.1-F e K58.1-F de <i>K. pneumoniae</i>	86

ARTIGO 2

Figura 1 (A-D): Eletromicrografias do isolado K3C de <i>K. pneumoniae</i> submetido ao aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX).....	99
Figura 2 (A-D): Eletromicrografias do isolado K16R de <i>K. pneumoniae</i> controle e submetido a aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX).....	100

Figura 3 (A-D): Eletromicrografias do isolado K652 de *K. pneumoniae* controle e submetido a ceftazidima (CAZ), imipenem (IMP) e cefotaxima (CTX).....101

Figura 4 (A-D): Eletromicrografias do isolado K11CM de *K. pneumoniae* controle e submetido ao aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX).....102

Figura 5 (A-D): Eletromicrografias do isolado K3CM de *K. pneumoniae* controle e submetido ao aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX).....103

LISTA DE TABELAS

TESE

Tabela 1 – CIM dos isolados de *K. pneumoniae* obtidos em ambiente hospitalar e de infecção na comunidade frente a cefotaxima, ceftazidima, aztreonam e imipeneme e sub-CIMs utilizados para análise pela MET e MEV.....50

Tabela 2 – CIM dos isolados de *K. pneumoniae* obtidos de microbiota frente a ampicilina e amoxicilina e sub-CIMs utilizados para análise pela MET e MEV.....50

ARTIGO 1

Tabela 1 – CIM de isolados de *Klebsiella pneumoniae* obtidos em hospitais e sub-CIM usado para análise por microscopia eletrônica.....79

Tabela 2 – CIM dos isolados de *K. pneumoniae* obtidos de microbiota e sub-CIM usado para microscopia eletrônica.....79

ARTIGO 2

Tabela 1 - CIM dos isolados de *K. pneumoniae* obtidos em ambiente hospitalar e de infecção na comunidade frente a cefotaxima, ceftazidima, aztreonam e imipenem e sub-CIMs utilizados para análise pela MET.....98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adquirida na Comunidade
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidima
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMT	TEM do complexo mutante
CPqAM	Centro Pesquisas Aggeu Magalhães
CPS	Cápsula polissacarídica
CTX	Cefotaximase
CTX	Cefotaxima
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucléico)
ESAC	AmpC de Espectro Extendido
ESBL	Extended Spectrum β -lactamase (Beta-lactamase de amplo espectro)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IMP	Imipenem
IrAS	Infecção relacionada à Assistência à Saúde
ITU	Infecções do Trato Urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
L	Litro
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MBLs	Metallo- β -Lactamases
MDR	Multidroga-Resistente
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
OXA	Oxacilinase
PBPs	Protein Binding Penicilin (Proteína fixadora de penicilina)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
pH	potencial Hidrogeniônico
pmol	picomol
rpm	rotação por minuto
SHV	Sulfhydryl reagent variable
Sub-CIM	Sub-Concentrações Inibitórias Mínimas
TBE	TRIS-Borato-EDTA
TEM	Temoniera
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
μ g	Micrograma

μL
 μm

Microlitro
Micrômetro

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
2.2 Parede celular das bactérias gram-negativas	25
2.3 Cápsula polissacarídica (CPS)	26
2.4 Estrutura e ação dos antibióticos β -lactâmicos	29
2.5 Cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos	32
2.6 Resistência bacteriana a antibióticos β -lactâmicos	33
2.6.1 Classificação funcional das β -lactamases	37
2.7 Alterações estruturais induzidas por antimicrobianos β -lactâmicos	39
3. HIPÓTESE	42
4. OBJETIVOS	43
4.1 Geral	43
4.2 Específicos	43
5. MATERIAIS E MÉTODOS	44
5.1 Isolados bacterianos	44
5.2 Extração de DNA	45
5.3 Amplificação dos genes <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{KPC}	45
5.4 Amplificação de região promotora do operon relacionado a produção de CPS	46
5.5 Eletroforese em gel de agarose	46
5.6 Sequenciamento de DNA	47
5.7 Determinação da ultra-estrutura bacteriana por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	48
5.8 Determinação da produção de CPS por MET	48
5.9 Análise da morfologia bacteriana pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	49
6. ASPECTOS ÉTICOS	51
7. RESULTADOS	52
7.1 ARTIGO 1 - submetido à Revista Microbiology (Apêndice A)	52
7.2 ARTIGO 2 - submetido à Revista Microbial Drug Resistance (Apêndice B)	87
8. CONCLUSÕES	108
REFERÊNCIAS	109
APÊNDICE A - Artigo 1: submetido à Revista Microbiology	118
APÊNDICE B - Artigo 2: submetido à Revista Microbial Drug Resistance	151
ANEXO A – Comprovante de submissão à Revista Microbiology	171
ANEXO B – Normas da Revista Microbiology	172
ANEXO C - Comprovante de submissão à Revista Microbiol Drug Resistance	188
ANEXO D – Normas da Revista Microbial Drug Resistance	189

1. APRESENTAÇÃO

Klebsiella pneumoniae é um dos mais comuns microrganismos gram-negativos multidroga-resistente (MDR) com disseminação mundial, sendo responsável por alta morbi-mortalidade em unidades de saúde (MAMMINA et al., 2012).

Os β -lactâmicos pertencem a uma classe extremamente importante de antimicrobianos, por serem amplamente utilizados para tratamento de infecções graves adquiridas em hospitais e na comunidade (DENISUIK et al., 2013). As penicilinas, cefalosporinas e os carbapenêmicos estão inclusos nos regimes de tratamento de escolha para muitas doenças infecciosas, incluindo por *K. pneumoniae* (BUSH; JACOBY, 2010).

A resistência fenotípica a antibióticos β -lactâmicos em isolados de *K. pneumoniae* MDR é devido, primordialmente, a produção de β -lactamases de amplo espectro (ESBL - Extended Spectrum β -Lactamases) principalmente do grupo 2, TEM, SHV e CTX (COQUE et al., 2002; CHANAWONG et al., 2002; WALLACE et al., 2010).

Recentemente, a necessidade do uso de carbapenêmicos para tratamento de infecções por isolados de *K. pneumoniae* MDR, por serem considerados antibióticos de última linha de tratamento, tem promovido a emergência e disseminação de isolados não susceptíveis a esta classe de antimicrobianos (MAMMINA et al., 2012; LASCOLS et al., 2013). Surtos envolvendo isolados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos estão associados à carbapenemase KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). Estes isolados são resistentes a maioria dos antimicrobianos disponíveis, sendo usualmente sensíveis apenas a polimixinas e tigeciclina (SAIDEL-ODES; BORER, 2013). A produção desta carbapenemase está recentemente envolvida em casos de infecção relacionada à assistência à saúde (IrAS) por isolados de *K. pneumoniae* em diferentes países, inclusive no Brasil, ameaçando ainda mais a efetividade do tratamento com antibióticos β -lactâmicos (WALLACE et al., 2010).

A rápida e dinâmica disseminação de resistência a antibióticos β -lactâmicos em bactérias gram-negativas tem alertado pesquisadores em todo o mundo para este grande problema epidemiológico (EMPEL et al., 2008). O aumento da prevalência de bactérias resistentes aos antibióticos prenuncia uma era pós-

antibiótico iminente, caracterizada pela diminuição da eficácia dos antibióticos comuns e aplicação rotineira de abordagens terapêuticas diferentes e complementares para o tratamento de infecções bacterianas (CRESS et al., 2013). Portanto, novas estratégias precisam ser propostas, onde os antibióticos antigos e descartados, ou mesmo rejeitados, devem ser novamente investigados, reaproveitados e utilizados quando necessário (BUSH et al., 2011).

Casos de sucesso terapêutico utilizando apenas carbapenêmicos em infecções por isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC tem sido relatados, mas ainda não se dispõe de sugestões de como estes antibióticos podem ter contribuído para estes acontecimentos (WEISEMBERG et al., 2009).

Recentemente, o estudo de Hirsh et al. (2013) demonstrou a ação *in vitro* e *in vivo* da combinação de antibióticos β -lactâmicos e aminoglicosídeos em isolados de *K. pneumoniae* MDR, objetivando identificar novas opções terapêuticas para tratamento de infecções por esta espécie bacteriana. Este estudo demonstrou experimentalmente, que a combinação de doripenem e amicacina pode ser bem sucedida. Apesar da grande necessidade de validação de novas terapias combinadas para tratamento de espécies bacterianas com perfil fenotípico MDR, também é importante conhecer quais efeitos podem ser produzidos com o uso de antibióticos sozinhos frente isolados MDR de importância clínica, como *K. pneumoniae*.

Além da grande competência na aquisição de genes de resistência, *K. pneumoniae* pode produzir ainda alguns fatores de virulência que contribuem para a patogênese bacteriana. A produção de cápsula polissacarídica (CPS) é considerado o principal fator de virulência predominante nesta espécie bacteriana, por mediar a resistência a fagocitose por células fagocíticas do sangue humano, além de proteger contra a dissecação e ataque de fagos (SCHEMBRI et al., 2005; CRESS et al., 2013).

K. pneumoniae é considerada um importante agente causador de infecções adquiridas na comunidade (AC), incluindo uma forma grave de pneumonia e abscesso hepático piogênico, complicado por meningites e endoftalmites metastáticas (TZOUVELEKIS et al., 2012; PAN et al., 2013), onde a produção de CPS tem assumindo uma forte relação com a severidade da infecção causada por esta espécie bacteriana (PAN et al., 2013). No entanto, não existem estudos que determinem a interferência de antibióticos β -lactâmicos na produção de CPS por

isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL e KPC.

A rápida disseminação e a escassez de novas alternativas para tratamento de infecções causadas por isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL e KPC, destaca a necessidade de realizar novos estudos que reavaliem a ação de antibióticos clinicamente importantes, além de testar sua interferência na produção do principal fator de virulência desta espécie bacteriana. Este estudo teve o objetivo de determinar a ação de antibióticos β -lactâmicos em isolados de *K. pneumoniae* portadores de diferentes genes de resistência, desenvolvendo embasamento teórico para futura proposição de novas terapias combinadas efetivas, utilizando β -lactâmicos, para o tratamento de infecções causadas por esta espécie bacteriana.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, foi descrito primeiramente pelo microbiologista alemão Edwin Klebs no final do século XIX. Essas bactérias têm como habitat natural o trato intestinal de seres humanos e animais, sendo também encontradas em águas de superfície, plantas e solo. Muitas cepas de *Klebsiella* hidrolisam uréia lentamente produzindo uma cor rosa-pálida na superfície inclinada do ágar uréia Christensen. A produção de indol a partir do triptófano pode ser utilizada para diferenciar duas espécies deste gênero, *K. pneumoniae* é indol negativa e *Klebsiella oxytoca* é indol-positiva, sendo ambas as espécies imóveis (KONEMAN et al., 2008).

Taxonomicamente, as espécies do gênero *Klebsiella* são classificadas em *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella ornithinolytica*. Usualmente refere-se à espécie *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* com *K. pneumoniae*, e às outras duas subespécies como *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis* (PODSCHUM; ULLMANN, 1998).

K. pneumoniae é um bacilo gram negativo imóvel, não esporulado, fermentador de lactose com produção de ácidos, apresentando colônias mucóides com consistência viscosa em meios de seleção primária (KONEMAN et al., 2008). Como espécie mais importante do gênero é saprófita de seres humanos e outros mamíferos, colonizando o trato gastrointestinal, pele e nasofaringe, além de diversos nichos ambientais em solos e água (BAGLEY, 1985; TZOUVELEKIS et al., 2012). Esta espécie bacteriana é encontrada com frequência de 19% nas fezes e de 1 a 6% na orofaringe de indivíduos saudáveis, podendo haver um aumento desta prevalência para 20% em pacientes hospitalizados (KONEMAN et al., 2008).

K. pneumoniae é um patógeno oportunista isolado com maior frequência de amostras clínicas, sendo comumente associado com infecções do trato urinário adquirida em hospitais, septicemia, infecções de ferida, além de uma forma clássica de pneumonia primária, apresentando características radiográficas anormais quando

comparada com algumas infecções piogênicas, com alta taxa de mortalidade quando não tratadas (PODSCHUM; ULLMANN, 1998; PAN et al., 2008; SAIDEL-ODES; BORER, 2013).

Por ser um patógeno oportunista, *K. pneumoniae* infecta primariamente indivíduos imunocomprometidos, quando hospitalizados e com doenças pré-existentes e em condições debilitantes, como o alcoolismo, *diabetes mellitus* e doença pulmonar obstrutiva crônica (PODSCHUM; ULLMANN, 1998; KONEMAM et al., 2008). Infecções por *K. pneumoniae* principalmente em pacientes imunocomprometidos ou em condições debilitantes, muitas vezes ocorrem por uma auto-infecção da microbiota da orofaringe ou entérica do paciente, podendo causar também infecções extra-pulmonares, como enterite e meningite em lactentes, além de infecções urinárias e septicemias em crianças e adultos (PODSCHUM; ULLMANN, 1998). O trato urinário é um dos locais mais comuns de infecções, principalmente em pacientes com doenças renais ou com *diabetes mellitus* (LYE et al., 1992).

No passado, *K. pneumoniae* foi considerada um importante agente causador de infecções adquiridas na comunidade (AC), incluindo uma forma grave de pneumonia. Recentemente, a pneumonia AC devido a *K. pneumoniae* tornou-se rara, trazendo espaço a novas manifestações de infecções AC, tais como abscesso hepático piogênico complicado por meningites e endoftalmites metastáticas (TZOUVELEKIS et al., 2012; PAN et al., 2013). Aproximadamente 50% dos indivíduos acometidos por estas infecções possuem algum fator predisponente, como a *diabetes mellitus*. Estas infecções tem sido relacionadas a isolados de *K. pneumoniae* produtores de CPS, assumindo uma forte relação com a severidade da infecção e tornando a definição da prevalência do tipo capsular relacionada a cada doença, crucial para seu controle e prevenção (PAN et al., 2013).

Seis a 17% das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IrAS) do trato urinário são causadas por *K. pneumoniae*. Estas infecções são frequentemente correlacionadas ao uso de cateteres, indicando que a adesão bacteriana e a formação de biofilme são importantes no estabelecimento da infecção (SCHEMBRI et al., 2005). *K. pneumoniae* representa 1-2% dos episódios de Infecções do trato urinário (ITU) entre os adultos saudáveis, mas esta envolvida em 5-17% dos episódios de ITU complicadas, incluindo infecções complicadas associadas à sonda vesical de demora (SHILO et al., 2013). *K. pneumoniae* é implicado ainda como o

segundo mais comum agente patogênico envolvido com infecções de corrente sanguínea dentre as bactérias gram-negativas, perdendo apenas para *Escherichia coli* (MEATHERALL et al., 2009; LIN et al., 2014).

Apesar dos avanços da terapia antimicrobiana, a mortalidade e morbidade associadas a casos de infecções por *K. pneumoniae* AC e IrAS continuam significantes mundialmente. No Canadá, a taxa de mortalidade devido a bacteremia por *K. pneumoniae* chegou a 20% em 2009 (MEATHERALL et al., 2009). Números ainda mais alarmantes foram obtidos em estudos analisando casos de bacteremia por isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL e KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), relatando taxas de mortalidade de até 30% e 50%, respectivamente (BEN-DAVID et al., 2012; QUERSHI et al., 2012).

O alto envolvimento de *K. pneumoniae* em infecções graves, está relacionada à grande facilidade desta espécie na aquisição de plasmídeos de multidroga-resistência, durante o processo de conjugação bacteriana (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008), os quais podem possibilitar resistência a diferentes classes de antimicrobianos inclusive aos β -lactâmicos, sendo um fator limitante e uma das maiores causas de falhas no tratamento das infecções causadas por esta bactéria. Isolados de *K. pneumoniae* podem produzir ainda, alguns fatores de virulência que contribuem para a patogênese bacteriana, incluindo adesinas fimbriais, sideróforos, antígeno O e cápsula polissacarídica (CPS) (SCHEMBRI et al., 2005).

A CPS é considerada o principal fator de virulência nesta espécie bacteriana, consistindo de uma camada elaborada de polissacarídeos de alto peso molecular, associados na superfície celular bacteriana de composição dependente do isolado, existindo 78 sorotipos capsulares identificados (SCHEMBRI et al., 2005; PAN et al., 2013). A CPS contribui para a patogênese mediando a resistência a fagocitose por células fagocíticas do soro humano, por esconder os componentes da superfície da célula que de outra forma poderiam provocar resposta imune do hospedeiro, além de proteger contra a dissecação e ataque de fagos (SCHEMBRI et al., 2005; CRESS et al., 2013).

2. 2 Parede celular das bactérias gram-negativas

O envelope celular de bactérias gram-negativas possui estrutura complexa. A membrana citoplasmática é protegida do estresse e pressão osmótica pela rígida camada de peptidoglicano. O papel crítico desta camada é melhor exemplificado no momento em que constituem alvos letais dos antibióticos β -lactâmicos (WHITFIELD; NAISMITH, 2008).

A parede celular das bactérias gram-negativas é mais delgada que a das gram-positivas, porém é estruturalmente mais complexa. Na parte externa da membrana citoplasmática localiza-se o espaço periplasmático, um compartimento que contém várias enzimas e que se encontra entre a membrana citoplasmática e a porção interna da parede celular. Uma simples unidade de camada glicopeptídica forma a borda externa do espaço periplasmático. Apenas metade das cadeias peptídicas unidas aos resíduos de ácido N-acetilmurâmico estão realmente intercruzadas. Fora da fina camada de glicopeptídeos encontra-se a membrana externa que tem constituição similar a membrana citoplasmática e que encontra-se fixa a camada glicopeptídica por uma lipoproteína. Outro componente estrutural exclusivo da membrana externa das bactéria gram-negativas é o lipopolissacarídeo (LPS), os quais são os principais determinantes antigênicos de superfície das bactérias gram-negativas e que são responsáveis pela atividade de endotoxinas das células gram-negativas (KONEMAN et al., 2008; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A síntese da parede celular bacteriana envolve uma via metabólica complexa, que começa com os precursores do citoplasma que são ligados por via enzimática de uma série de reações químicas, antes de ser transportado para a superfície externa da membrana citoplasmática. O N-acetilmuramil-pentapeptídeo resultante contém um terminal dipeptídeo D-Ala-D-Ala que é incorporado no crescimento da estrutura do peptidoglicano, formando a parede da célula, utilizando transglicosilases e transpeptidases específicas para facilitar a reticulação dos componentes da parede celular de bactérias em fase de replicação (BUSH, 2012).

2.3 Cápsula polissacarídica (CPS)

A primeira linha de defesa para a maioria das bactérias patogênicas é constituída por uma barreira física e imunológica conhecida como cápsula polissacarídica (CPS), geralmente composta de uma camada viscosa de hidratos de

carbono ligados covalentemente à parede celular de bactérias gram-positivas ou a lipídeos da membrana externa em muitas bactérias gram-negativas (CRESS et al., 2013).

O material capsular usualmente é de natureza polissacarídica, formado de polímeros de um único monossacarídeo (glicana, destrano, lenavo) ou de heteropolissacarídeos contendo hexoses e pentoses, além de ribitol, glicerol ou outros alcoóis derivados de açúcares, estando os fosfatos presentes com frequência. A biossíntese e exportação de polissacarídeos para o exterior da célula, que constituem a cápsula protetora extracelular de bactérias gram-negativas, é um processo complexo que necessita de muitas proteínas e componentes presentes no citoplasma, periplasma e proteínas de membrana interna e externa (WHITFIELD, 2006; FORD et al., 2009). Precusores ativados no citoplasma (açúcares de nucleotídeo monofosfo e difosfo) são montados em um polissacarídeo nascente por enzimas associadas a membrana interna, onde uma via de translocação move o polímero nascente entre o periplasma e através da membrana externa até a superfície celular (WHITFIELD, 2006).

O *cluster* gênico envolvido na biossíntese de CPS em *K. pneumoniae* tem uma organização conservada semelhante e muitas vezes idêntica ao *cluster* gênico em *Escherichia coli*. A região 3' é específica do sorotipo e codifica um sistema de enzimas de biossíntese Wzy-dependentes, incluindo as enzimas para a produção de qualquer açúcar de nucleotídeos dedicado a síntese capsular, glicosiltransferases e duas proteínas de membrana interna (Wzy e Wzx). A polimerase Wzy monta polímeros *undecaprenyl* ligados ao difosfato, utilizando unidades de repetição ligadas a lipídios exportados pela proteína de membrana interna Wzx (WHITFIELD, 2006). Os *cluster* gênicos dos sorotipos de *K. pneumoniae* K1, K2, K5, K20, K54 e K57 têm diferentes alelos em ambos os locus Wzy e Wzx (FANG et al., 2007).

As estruturas capsulares de algumas bactérias possibilitam aos microrganismos escapar da fagocitose, impedindo a interação entre a superfície da célula bacteriana e a célula fagocitária ou ocultando componentes da superfície celular bacteriana que de outro modo, poderiam interagir com as células fagocitárias e levar à ingestão do microrganismo (KONEMAN et al., 2008; CRESS et al., 2013).

A produção de CPS é considerada o maior fator de virulência em isolados de *K. pneumoniae*, sendo o maior efeito patogênico causado pela sua presença a diminuição da fagocitose por polimorfonucleares humanos (HELD et al., 2000; PAN

et al., 2008; CRESS et al., 2013). Sua composição é altamente dependente da espécie e até mesmo do isolado mas, apesar desta diversidade, algumas espécies distintas têm demonstrado estruturas indênticas para a biossíntese da CPS (DEANGELIS; WHITE, 2002). A detecção sorológica das formas capsulares constituem a base do teste de Quellung, o qual pode ser empregado para identificar ou subtipar diversas bactérias patogênicas para o homem incluindo *K. pneumoniae*, existindo 78 sorotipos distintos de antígenos K reportados nesta espécie bacteriana (HENNEQUIN; FORESTIER, 2007; PAN et al., 2013). Estudos epidemiológicos apresentam que 70% de todos os casos de bacteremia por isolados de *Klebsiella* são causados por apenas 25 dos 78 sorotipos existentes e que os sorotipos K1 e K2 são os mais prevalentes entre os isolados mais virulentos (HENNEQUIN; FORESTIER, 2007).

A CPS é capaz de proteger a célula da dessecação e de materiais tóxicos no ambiente, além de promover a concentração de nutrientes na superfície da célula devido a sua natureza polianiónica (KONEMAN et al., 2008). Em bactérias gram-negativas os polissacarídeos capsulares estão muitas vezes associadas à membrana externa na extremidade redutora, através de lipídeos ligados covalentemente e inseridos na bicamada lipídica da membrana, fornecendo uma camada de superfície saturada em água, com polissacarídeos de elevado peso molecular que limitam a dessecação em face das condições ambientais (CRESS et al., 2013).

A CPS também oferece resistência à ação bactericida dos fatores do complemento e dos anticorpos séricos. *In vivo* e *in vitro*, o material capsular de diversos organismos é sintetizado em abundância e lançado no fluído (soro, liquor, urina) durante a infecção por determinadas bactérias capsuladas (KONEMAN et al., 2008). A habilidade dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL de escapar da atividade fagocítica dos polimorfonucleares neutrófilos pode ser responsável pelo grande potencial patogênico destas bactérias (SAHLY et al., 2002).

A maioria dos isolados de *K. pneumoniae* são encapsulados por CPS de espessura considerável, responsável pelo aspecto brilhoso e mucóide das colônias bacterianas em placas de Agar (BRISSE et al., 2004). As células encapsuladas aderem *in vitro* a células intestinais com padrão agregativo, contribuindo para o desenvolvimento da infecção (MADSON et al., 1994).

K. pneumoniae causa predominantemente de ITU, mas as infecções podem ocorrer em qualquer parte do corpo (HENNEQUIN; FORESTIER, 2007). Independente do local da infecção o primeiro estágio do processo fisiopatológico consiste na colonização do trato gastrointestinal do paciente (DE CHAMPS et al., 1989; HENNEQUIN; FORESTIER, 2007). Estudos epidemiológicos tem demonstrado que a etapa inicial no desenvolvimento de uma IrAS por isolados de *K. pneumoniae*, envolve a colonização do trato gastrointestinal onde a presença de CPS desenvolve um importante papel nesta etapa inicial de colonização (FAVRE-BONTÉ et al., 1999). A presença de CPS também pode ser importante em outras estruturas e funções como transporte de membrana e processos metabólicos como o metabolismo da uréia (HENNEQUIN; FORESTIER, 2007).

A produção de anticorpos opsonizantes é um importante aspecto na imunidade contra *K. pneumoniae*. Isolados encapsulados de *K. pneumoniae* também produzem uma grande quantidade de células livres de CPS contribuindo para a patogenicidade bacteriana, pois uma vez circulantes as células livres de CPS também podem fixar e neutralizar anticorpos que de outra forma iriam opsonizar bactérias produtoras de CPS (DOMENICO et al., 1994).

2.4 Estrutura e ação dos antibióticos β -lactâmicos

Os agentes antimicrobianos que funcionam através da interação com as paredes celulares de bactérias ou membranas celulares incluem alguns dos agentes antibacterianos mais utilizados na prática médica e veterinária. Os agentes que atuam sobre essas características essenciais de bactérias patogênicas são muitas vezes consideradas como agentes bactericidas, porque sua ação é tão prejudicial para a célula que a viabilidade é reduzida, tornando-os agentes atraentes para fins terapêuticos (BUSH, 2012).

Os antibióticos β -lactâmicos tem sido utilizados segura e eficientemente por mais de 70 anos, inicialmente para tratamento de infecções causadas por cocos gram-positivos (BUSH, 2012). Estes antimicrobianos são os mais prescritos mundialmente, devido a sua boa atividade e baixa toxicidade, sendo uma classe extremamente importante de antimicrobianos para o tratamento de infecções graves

adquiridas em hospitais e na comunidade (DENISUIK et al., 2013; HAEGGMAN et al., 2004). Neste grupo estão incluídas as penicilinas, as cefalosporinas, os carbapenêmicos e os monobactâmicos, sendo todos portadores de um anel β -lactâmico, formado de três átomos de carbono e um de nitrogênio (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; BUSH, 2012).

A entrada do antimicrobiano nas células bacterianas se dá por proteínas denominadas proteínas porinas, as quais se comportam como canais iônicos que se localizam na membrana externa de bactérias gram-negativas, possuindo afinidade específica pelos diferentes antibióticos (KONEMAN et al., 2008; TRIPATHI, 2006).

Os β -lactâmicos agem na síntese da parede celular bacteriana, interferindo no crescimento e desenvolvimento normal das células bacterianas. Nos microrganismos gram-positivos a parede celular tem uma espessura constituída por 50 a 100 moléculas de peptidoglicano, enquanto nos gram-negativos tem uma espessura constituída por apenas 1 a 2 moléculas (BRUNTON; CHABNER; KNOLMAN, 2012). A biossíntese do peptidoglicano envolve cerca de trinta enzimas bacterianas, incluindo as transpeptidases e as glicosiltransferases, podendo ser dividida em três estágios.

No primeiro estágio as bactérias sintetizam um pentapeptídeo do UDP-ácido-N-acetilmurâmico e UDP-N-acetilglicosamina. No segundo, ocorre a ligação dos dois aminoácidos, onde os radicais de peptidoglicano são unidos entre si formando longos filamentos e o UDP é clivado. Na terceira etapa de síntese, onde os antibióticos β -lactâmicos agem, ocorre o término da formação de ligação cruzada que consiste na clivagem da D-alanina terminal das cadeias peptídicas por transpeptidases (WAXMAN; YOCUM; STROMINGER, 1980). A energia liberada pela clivagem é utilizada no estabelecimento de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas dos filamentos vizinhos, dando estabilidade e rigidez à parede celular (TRIPATHI, 2006; BRUNTON; CHABNER; KNOLMAN, 2012).

As proteínas relacionadas a síntese final do peptidoglicano constituem as proteínas fixadoras de penicilina (PBPs - protein binding penicilin). As PBPs localizam-se na parte externa da membrana celular das bactérias, podendo ser classificadas em três classes, baseado na presença do domínio funcional conservado (MCPHERSON; POPHAM, 2002; TRIPATHI, 2006; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Apenas a classe A de PBPs tem um domínio N-terminal que contém seqüências de aminoácidos conservados, encontrados em todas as

glicosiltransferases responsáveis pela polimerização do peptidoglicano (MCPHERSON; POPHAM, 2002).

As PBPs variam em suas afinidades pelos diferentes antibióticos β -lactâmicos, embora as ligações se tornem covalentes. Algumas PBPs de bactérias gram-negativas são responsáveis pela síntese do peptidoglicano, outras são necessárias para a manutenção da forma de bastonetes da bactéria, ou para a formação de septos durante a divisão bacteriana (BRUNTON; CHABNER; KNOLMAN, 2012). Cada PBP tem um papel específico na proliferação e na manutenção da morfologia bacteriana, onde o bloqueio da PBP-1 leva a rápida lise bacteriana, da PBP-2 a formação de células esféricas e da PBP-3 a formação de longos filamentos, causados pela incapacidade de formação de septos de divisão após a duplicação da massa celular bacteriana (BUIJS et al., 2008; HORII et al., 1998).

As PBPs bacterianas possuem um sítio ativo de serina que pode ser acetilado pelo β -lactâmico durante o crescimento bacteriano. A rápida acetilação seguida por uma desacetilação muito lenta resulta na inativação da PBP levando a morte celular (MASSOVA; MOBASHERY, 1998; BUSH, 2012).

Quando as bactérias se dividem na presença de um antibiótico β -lactâmico são produzidas formas deficientes de parede celular, como o ambiente intracelular bacteriano é mais hiperosmótico, as células intumescem e sofrem ruptura (WHITFIELD; NAISMITH, 2008; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Em certas condições e no caso de alguns microrganismos, são produzidas formas filamentosas ou de morfologia indefinida, incapazes de se multiplicar. O efeito lítico destas substâncias também pode se dever a não repressão de algumas autolisinas bacterianas que normalmente funcionam na divisão celular (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; TRIPATHI, 2006).

A grande utilização dos β -lactâmicos possibilitou a seleção de isolados resistentes a esta classe de antimicrobianos, levando a elaborações mais recentes de antibióticos, visando a maior eficiência frente a isolados bacterianos portadores de resistência. Na maioria dos casos a resistência a este grupo de antimicrobianos é conferida pela produção de enzimas chamadas de β -lactamases, capazes de degradar o anel β -lactâmico dos antibióticos, transformando-os em produtos inativos (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; HAEGGMAN

et al., 2004). Estas enzimas tem sido grandes alvos de estudos microbiológicos, bioquímicos e genéticos no mundo inteiro.

Diversas investigações têm descrito inúmeros tipos de proteínas bacterianas, com a habilidade de interagir com uma variedade de moléculas descritas como substratos ou inibidores (BUSH; FISHER, 2011). Devido a esta diversidade de características enzimáticas das β -lactamases, muitas tentativas foram realizadas para categorizar estas enzimas pelo uso de seus atributos bioquímicos (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

2.5 Cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos

As cefalosporinas são antibióticos bactericidas que formam um grupo de antibióticos semi-sintéticos derivados da “cefalosporina C”, obtida do fungo *Cephalosporium* spp atualmente denominado *Acremonium*. São quimicamente relacionadas às penicilinas, onde o núcleo é constituído por um anel β -lactâmico unido a um anel diidrotiazina possuindo mesmo mecanismo de ação das penicilinas, porém se ligando a proteínas diferentes. Através da adição de diferentes cadeias laterais na posição 7 do anel β -lactâmico, alterando assim o espectro de atividade, e na posição 3 do anel diidrotiazina, alterando a farmacocinética da droga, pode-se produzir numerosos compostos sintéticos. As cefalosporinas podem ser divididas em cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta geração, de acordo com a ordem cronológica de seu desenvolvimento, levando em consideração o espectro e a potencia do agente antibacteriano (TRIPATHI, 2006; BRUNTON; CHABNER; KNOLMAN, 2012).

As cefalosporinas de primeira geração foram desenvolvidas na década de 60 do século XX, exibindo alta afinidade contra bactérias gram-positivas e menor, mas relativamente moderada, atividade contra bactérias gram-negativas. Como exemplos de cefalosporinas de primeira geração têm-se a cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefadroxil, cefradina. As cefalosporinas de segunda geração, tais como a cefoxitina, cefuroxima e cefaclor, possuem maior atividade contra microrganismos gram-negativos mas são muito menos ativas do que os agentes de terceira geração.

As cefalosporinas de terceira geração, onde inclui-se a ceftazidima, a cefotaxima e cefoperazona, são menos ativas contra cocos gram-positivos, exibindo

no entanto, muito mais atividade contra as bactérias gram-negativas, incluindo isolados produtores de β -lactamases clássicas. Estes antibióticos não possuem no entanto, efetividade contra isolados produtores de ESBLs, diminuindo as opções terapêuticas para tratamento de infecções por estes isolados. As cefalosporinas de quarta geração, tal como a cefepima e cefpiroma, possuem amplo espectro de atividade e exibem maior estabilidade em relação às β -lactamases (TRIPATHI, 2006; BRUNTON; CHABNER; KNOLMAN, 2012).

O monobactâmico aztreonam é um composto β -lactâmico monocíclico isolado de *Chromobacterium violaceum*. Este antibiótico interage com PBPs em microrganismos sensíveis e induz a formação de longas estruturas filamentosas. Mostra-se resistente a muitas das β -lactamases que são elaboradas por diferentes espécies bacterianas gram-negativas, mas também é inativado pelas ESBLs (BRUNTON; CHABNER; KNOLMAN, 2012).

K. pneumoniae é o quarto patógeno mais isolado entre casos de septicemia em ambiente hospitalar, sendo encontrada uma alta taxa de produção de ESBLs nesta espécie bacteriana, tornando os carbapenêmicos a principal alternativa para terapêutica de infecções causadas por isolados produtores destas enzimas, visto serem resistentes a degradação destas enzimas bacterianas (CARVALHAES et al., 2010). Os carbapenêmicos são antibióticos β -lactâmicos que contêm um anel β -lactâmico diferindo das penicilinas por ser insaturado e conter um átomo de carbono em lugar do átomo de enxofre. Esta classe de β -lactâmicos possui ampla atividade frente diversas espécies bacterianas, sendo composta pelo imipenem, meropenem, doripenem e ertapenem (BRUNTON; CHABNER; KNOLMAN, 2012).

2.6 Resistência bacteriana a antibióticos β -lactâmicos

A resistência adquirida aos β -lactâmicos pode ocorrer basicamente por três mecanismos: alteração de proteínas alvo (PBPs), reduzindo assim a atividade do antibiótico; impermeabilidade da célula bacteriana ao antibiótico, impedindo a chegada do mesmo ao local de ação; e produção de β -lactamases que destroem o antibiótico utilizado. O mecanismo mais comum de resistência das enterobactérias aos β -lactâmicos é a produção de β -lactamases (BUSH, 2001). Entre os microrganismos gram-negativos a produção de β -lactamases representa o único

grande contribuidor para a resistência aos β -lactâmicos, incluindo resistência às oximino-cefalosporinas e carbapenêmicos (DENISUIK et al., 2013). Portanto, a resistência aos antibióticos β -lactâmicos mediada por β -lactamases foi provavelmente o mecanismo mais profundamente investigado ao longo da história das doenças infecciosas bacterianas (BUSH; FISHER, 2011).

As β -lactamases clássicas são enzimas capazes de inativar penicilinas e cefalosporinas de espectro estreito antes de atingirem seu alvo (ROBIN et al., 2005). A maioria dos isolados de *K. pneumoniae* carrega o gene para β -lactamase cromossômica de classe A SHV-1, que possui atividade limitada contra ampicilina, não hidrolizando antibióticos β -lactâmicos de amplo-espectro (NELSON; SEGAL; ELISHA, 2003). Estas β -lactamases podem ser codificadas por genes cromossômicos, como o *bla*_{SHV-1} e o *bla*_{LEN-1}, os quais conferem resistência a ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina, além de poderem estar presentes em genes plasmidiais, como o *bla*_{TEM-1}. As β -lactamases SHV-1 são encontradas em alta frequência (80 a 90%) em isolados de *K. pneumoniae* (CHAVES et al., 2001; BRADFORD, 2001).

A introdução na prática clínica de oximino-cefalosporinas para o tratamento de infecções por bactérias gram-negativas foi brevemente seguida pelo surgimento das β -lactamases de amplo espectro (ESBLs - Extended Spectrum β -Lactamase) derivadas das β -lactamases clássicas SHV-1, TEM-1 e TEM-2, conferindo resistência a cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos como o aztreonam (HAEGGMAN et al., 2004).

A partir de 1983 surgiram os primeiros relatos de isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBLs do tipo SHV-2 na Alemanha e do tipo TEM-3 na França. Estas enzimas diferem das β -lactamases originais por um ou poucos aminoácidos, conferindo atividade hidrolítica contra oximino-cefalosporinas, tais como a ceftazidima, cefotaxima e cefoperazona (SALADIN et al., 2002).

Em 1990 surgiram os primeiros relatos de enzimas do tipo TEM resistentes aos inibidores de β -lactamases utilizados em combinação com as penicilinas, com posterior surgimento de enzimas TEM com diferentes níveis de resistência ao ácido clavulânico e a oximino-cefalosporinas (ROBIN et al., 2007; BRADFORD, 2001). Atualmente, mais de 180 variantes do gene *bla*_{SHV} e mais de 210 *bla*_{TEM} tem sido relatadas (JACOBY; BUSH, 2014).

Outro grupo de ESBL, que apresenta alto perfil de hidrólise frente a cefotaxima e ceftriaxona com menos que 40% de identidade com as enzimas SHV e TEM, é o grupo de classe A CTX-M, amplamente encontrada em diferentes espécies da família Enterobacteriaceae, incluindo *K. pneumoniae* (SALADIN et al., 2002; SOGE et al., 2006; LIVERMORE et al., 2007). Enzimas CTX-M são um grupo de ESBLs que estão se espalhando rapidamente entre bactérias da família Enterobacteriaceae em todo o mundo (ROSSOLINI et al., 2008; WANG et al., 2013). A partir do isolamento inicial da enzima CTX-M-1 a partir de um paciente Europeu no final de 1980, mais de 130 variantes alélicas CTX-M já foram descritas (JACOBY; BUSH, 2014).

A família CTX-M de ESBLs é atualmente classificada em cinco principais grupos, de acordo com a identidade da sequência de aminoácidos: CTX-M-1 (incluindo CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-11, CTX-M-12, CTX-M-15 e CTX-M-22), CTX-M-2 (inclui a CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7 e Toho-1), CTX-M-8, CTX-M-9 (inclui Toho-2 e Toho-3) e CTX-M-25, sendo os membros das diversas linhagens, diferentes em 10 a 30% nos resíduos de aminoácidos (PAGANI et al., 2003; BONNET, 2004; WANG et al., 2013).

No Brasil, enzimas CTX-M foram identificadas em *E. coli*, *E. cloacae* e *K. oxytoca* e *K. pneumoniae* (BONNET et al., 2001; MINARINI et al., 2007; MINARINI et al., 2008; GARCIA et al., 2008; LOPES et al., 2010). A ESBL CTX-M pertencente ao grupo filogenético CTX-M2 é uma das enzimas CTX-M mais encontrada em isolados de Enterobacteriaceae no Brasil (PEIRANO et al., 2009).

O tratamento de infecções por isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBLs fica limitado ao uso de poucos antibióticos disponíveis, sendo frequentemente os carbapenêmicos a última linha de tratamento efetivo contra estas infecções (LASCOLS et al., 2013). No entanto, três grandes classes de enzimas capazes de hidrolisar carbapenêmicos são relatadas segundo a classificação molecular de Ambler: as β -lactamases de classe A: IMI-, SME-, GES-, NMCA- e KPC-types; de classe B: metallo- β -lactamases (MBLs) como a NDM-1, IMP e VIM-types; e as de classe D: oxacillinases da OXA-types. As β -lactamases de classe A são mais frequentemente encontradas (PEIRANO et al., 2009; VOULGARIS et al., 2014).

As β -lactamases de classe A, C e D incluem enzimas com serina no sítio ativo. As β -lactamase de classe B são metalloenzimas com sítio ativo dependente de zinco. As carbapenemases são β -lactamases com atividade hidrolítica eficiente

frente aos carbapenêmicos, resultando em MICs elevados para os β -lactâmicos, podendo ser classificadas em classe A, com origem cromossômica (SME, NMC e IMI) ou plasmidial (GES e KPC), B (metaloenzimas IMP, VIM, SPM e SIM) e D (OXA) (QUEENAN; BUSH, 2007).

A carbapenemase de classe A KPC é uma *broad-spectrum* β -lactamase primeiramente descrita em isolados de *K. pneumoniae* da Carolina de Norte em 2001 (YIGIT et al., 2001). Subsequentemente a KPC-2 e KPC-3 foram identificadas de isolados dos Estados Unidos da América (EUA) (SMITH MOLAND et al., 2003; WOODFORD et al., 2004). No Brasil, a enzima KPC-2 foi primeiramente identificada em isolados de *K. pneumoniae* obtidos em Recife-PE (MONTEIRO et al., 2009). Atualmente, esta carbapenemase tem sido relacionada como a principal forma de resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae*, sendo relatadas 15 variantes com disseminação em diferentes partes do mundo (JACOBY; BUSH, 2014).

Isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC tornaram-se um problema significativo em termos de saúde pública e evolução clínica, devido frequentemente não serem capazes de hidrolisar apenas carbapenêmicos, mas também cefalosporinas, penicilinas e o aztreonam, tornando o tratamento clínico um desafio considerável para os médicos (WALLACE et al., 2010; TUMBARELLO et al., 2012). Adicionalmente, estes isolados são resistentes a maioria dos antimicrobianos disponíveis por outros mecanismos, sendo usualmente sensíveis apenas a polimixinas e tigeciclina (SAIDEL-ODES; BORER, 2013).

Enterobacteriaceae produtoras de KPC têm causado numerosos surtos de infecção em vários locais do mundo (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; TUMBARELLO et al., 2012). Devido a maioria dos relatórios sobre estes surtos ser analisado sobre os aspectos da epidemiologia molecular ou do perfil de susceptibilidade *in vitro* dos isolados aos antimicrobianos, menos atenção tem sido focada nos medicamentos usados para tratar as infecções. Em casos de infecções de corrente sanguínea por isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC, foi sugerido o tratamento combinado com duas ou mais drogas com atividade *in vitro* contra os isolados, incluindo um carbapenêmico, visando uma maior efetividade em relação a monoterapia ativa (TUMBARELLO et al., 2012).

Bulik et al. (2010), demonstrou o aumento da atividade do doripenem sozinho, farmacodinamicamente otimizado contra isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC. Em outro estudo, foi avaliada a eficácia da combinação de ertapenem e

doripenem em modelo *in vitro* e *in vivo* em camundongos, demonstrando que a combinação destes antimicrobianos teve eficácia aumentada quando comparado aos agentes isolados (BULIK et al., 2011). Baseado nestes estudos, o sucesso da combinação terapêutica do ertapenem e doripenem, em infecção complicada por um isolado de *K. pneumoniae* produtor de KPC com resistência a colistina, foi relatado recentemente (CECCARELLI et al., 2013).

Maiores taxas de sucesso terapêutico podem ser obtidas quando existe uma eficiente detecção inicial de resistência aos carbapenêmicos. Em estudo realizado por Weisemberg et al. (2009) pode ser sugerido que pacientes infectados com isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC identificado inicialmente como resistentes, apresentaram uma maior taxa de sucesso no tratamento quando comparados com pacientes infectados com isolados cujos testes iniciais demonstraram falha na detecção de resistência. A maioria dos pacientes infectados com resultados falhos de susceptibilidade ao imipenem, foram tratadas com imipenem ou meropenem e mais da metade experimentaram falha clínica ou microbiológica após o tratamento com um carbapenêmico sozinho. Por outro lado, sucessos clínicos e microbiológicos com carbapenêmicos foram observados em vários pacientes, mas o grau que o tratamento com o carbapenêmico contribuiu para esses resultados não foi determinado.

2.6.1 Classificação funcional das β -lactamases

As β -lactamases são enzimas bastante diversificadas, podendo ser agrupadas em quatro classes moleculares baseada na sequência de aminoácidos apresentada pelas enzimas (A, B, C e D), ou em três grupos funcionais principais de acordo com a classificação mais recente proposta por Bush e Jacoby (2010), conforme se segue:

- Grupo 1: cefalosporinases pertencentes à classe molecular C, podendo ser codificadas em DNA cromossômico ou plasmidial de espécies da família Enterobacteriaceae e alguns outros microrganismos. Inclui as enzimas AmpC as quais são mais ativas frente a cefalosporinas do que a benzilpenicilina e têm uma elevada afinidade para o aztreonam, sendo geralmente resistentes à inibição pelo ácido clavulânico. Quando super-expressas pode levar à

resistência a carbapenêmicos. Outras enzimas, codificadas por genes plasmidiais, também são inclusas, tais como a CMY, ACT, DHA, FOX e MIR. Um novo subgrupo de enzimas 1e, variantes do grupo 1, possui maior atividade contra a ceftazidima e outros oximino- β -lactâmicos, tendo sido denominadas AmpC de espectro estendido (ESAC). Incluem a enzima GC1, CMY-10, CMY-19 e CMY-37.

- Grupo 2: Grupo funcional de β -lactamases que inclui as classes moleculares A e D, representando o maior grupo de β -lactamases, devido principalmente ao aumento da identificação de ESBLs durante os últimos 20 anos. O subgrupo de penicilinasas 2a representa um pequeno grupo de β -lactamases com espectro de atividade hidrolítica limitada, sendo enzimas predominantes em cocos gram-positivos. O subgrupo 2b caracteriza as β -lactamases que hidrolisam penicilinas e as primeiras cefalosporinas, sendo fortemente inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam. Incluem as enzimas TEM-1, TEM- 2 e SHV- 1. O subgrupo 2be compreende as ESBLs, enzimas de largo espectro com atividade contra penicilinas, cefalosporinas e oximino- β -lactâmicos, tais como cefotaxima, ceftazidima e aztreonam. Estas enzimas surgiram por substituições de aminoácidos nas enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV-1, aumentando o espectro de substratos. As ESBLs TEM e SHV foram unidas às enzimas funcionalmente semelhantes do tipo CTX-M, as quais possuem mais rápida proliferação. Como o nome indica, a maioria destas enzimas hidrolisam a cefotaxima mais facilmente do que a ceftazidima. Ao contrário das ESBLs SHV e TEM, são inibidas pelo tazobactam mais eficientemente do que por ácido clavulânico. Existem ainda ESBLs menos comuns não relacionadas as TEM, SHV, ou CTX-M, que incluem a BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2, e a família de enzimas VEB. Caracteristicamente, o subgrupo 2be de β -lactamases permanece sensível à inibição pelo ácido clavulânico, um recurso usado na sua detecção por laboratórios clínicos. As enzimas do subgrupo 2br possuem largo espectro de atividade com resistência ao ácido clavulânico. Atualmente 36 enzimas TEM caracterizadas funcionalmente tem essa propriedade e 72 SHV, mas nenhuma CTX-M demonstra essa característica. O subgrupo 2ber inclui enzimas TEM do complexo mutante (CMT), que combinam um espectro aumentado e uma relativa resistência à inibição pelo

ácido clavulânico. Os subgrupos 2c, 2ce, 2d, 2de, 2df, 2e são formados por penicilinases, carbenicilinases, oxacilinases, enzimas com atividade hidrolítica frente a carbapenêmicos e cefalosporinas com diferentes propriedades, sendo encontradas predominantemente em diferentes microrganismos. As carbapenemases serina-dependentes de classe molecular A constituem o subgrupo 2f, o qual inclui as enzimas SME, IMI, GES, NMC e mais recentemente KPC.

- Grupo 3: Inclui as Metallo- β -lactamases (MBLs), um grupo único de β -lactamases devido a diferenças estruturais e funcionais. Diferem estruturalmente das outras β -lactamases pela necessidade de um íon zinco no sítio ativo. Possuem capacidade de hidrolisar carbapenêmicos. Em contraste com as serina- β -lactamases, as MBL têm fraca afinidade ou capacidade de hidrolisar monobactâmicos e não é inibida pelo ácido clavulânico ou tazobactam, mas sim por agentes quelantes de íons metálicos, tais como o EDTA. São classificadas com base na estrutura (subclasses B1, B2, B3) ou função (subgrupos 3a, 3b, e 3c). Inclui as enzimas IMP, VIM, CAU-1, GOB-1, e FEZ-1. Recentemente, uma nova MBL de classe B a enzima NDM-1 (*New Delhi metallo- β -lactamase-1*) constitui uma outra fonte de preocupação a comunidade médica e científica, tendo sido encontrada em isolados de Enterobacteriaceae e outros gram-negativos como o *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas* spp e *Acinetobacter baumannii* (VOULGARIS et al., 2014).

2.7 Alterações estruturais induzidas por antimicrobianos β -lactâmicos

O elemento estrutural da parede celular bacteriana é o peptidoglicano, e a importância desta estrutura é demonstrada pelo número de agentes antimicrobianos que tem como alvo este componente ou que interferem em sua síntese (DERREL; DAVID, 2003). As PBPs são enzimas envolvidas na síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana e inclui as transpeptidases, transglicosilases, endopeptidases e carboxipeptidases. Os antibióticos β -lactâmicos se ligam covalentemente a estas PBPs em isolados sensíveis inibindo sua atividade normal, causando assim, diferentes alterações na estrutura da célula, incluindo na morfologia e na estrutura da parede celular bacteriana (DELONEY; NEAL, 1999; DERREL;

DAVID, 2003).

A liberação de endotoxinas bacterianas é consequência da ação antibacteriana, podendo ser variável, provavelmente devido aos diferentes mecanismos de ligação às PBPs pelos antibióticos, especialmente às PBP-1, -2 e -3, proteínas que constituem alvos primários dos β -lactâmicos em bactérias gram-negativas (HORII et al., 1998). A antibioticoterapia de infecções graves deve ser avaliada cuidadosamente por poder levar a deterioração clínica do paciente, devido a liberação de endotoxinas e consequente resposta inflamatória acentuada (BUIJS et al., 2008).

A ceftazidima e cefotaxima são antibióticos com afinidade relacionada a dose à PBP-3 e PBP-1 bacteriana. Altas doses de ceftazidima inibem a PBP-1 causando bacteriolise e baixa liberação de endotoxinas. Baixas doses deste antimicrobiano, no entanto, podem levar a inibição da PBP-3 com formação de filamentos bacterianos, associados com altas doses de liberação de endotoxinas (BUIJS et al., 2007). A ligação de β -lactâmicos a PBP-3 inibe a formação de septos, predispondo a formação de filamentos devido a incapacidade da célula concluir o processo de divisão após duplicação da massa bacteriana (BUIJS et al., 2008; HORII et al., 1998). Carbapenêmicos, tais como o imipenem, tem uma elevada afinidade para ambas PBP-1 e PBP-2, levando a formação de esferoplastos em espécies bacilares, formas associadas a baixa liberação de endotoxinas (HORII et al., 1998).

A submissão de isolados sensíveis de *P. aeruginosa* a sub-CIMs (sub-Concentrações Inibitórias Mínimas) de imipenem e ceftazidima leva a inibição da PBP-2 e PBP-3, respectivamente, causando aumento da liberação de endotoxinas quando submetido a ceftazidima (JACKSON; KROPP, 1992). No entanto, a liberação de endotoxinas bacterianas já foi relacionada a forma de administração do antibiótico e não à afinidade pelas PBPs (BUIJS et al., 2007).

Em outro estudo, utilizando isolado sensível de *E. coli* submetido ao imipenem, a ceftazidima e ao ciprofloxacino, a formação de filamentos bacterianos não foi relacionada a liberação de endotoxinas, mas sim ao antibiótico utilizado (TRAUTMAN et al., 1998). Adicionalmente, nem sempre a formação de filamentos por isolados resistentes ou sensíveis foi associada a um evento potencialmente perigoso. No estudo realizado por Rajeshwari et al. (2009), a formação de filamentos bacterianos em isolados de *K. pneumoniae* resistentes, devido a submissão a cefotaxima, foi considerada estressante por promover alongamento e deformação

das células bacterianas. Este evento foi atribuído à provável inibição da síntese de mucopeptídeo, devido fixação e inibição de PBPs pelo antibiótico, o que poderia diminuir a estabilidade da parede celular bacteriana, predispondo as células a lise.

Vários trabalhos relatam alterações morfológicas bacterianas diferenciadas, causadas por sub-CIMs de cefalosporinas de terceira geração e carbapenêmicos em isolados sensíveis de várias espécies bacterianas, devido a diferenças na afinidade dos β -lactâmicos às PBPs (JACKSON; KROPP, 1992; HORII et al., 1998; BUIJS et al., 2008). Desde 1987, Paul Williams relatou que sub-CIMs, em particular da penicilina e de cefalosporinas, podem exercer um efeito grave na morfologia bacteriana e conseqüentemente na superfície celular, onde os danos induzidos pelos antibióticos poderiam aumentar sensivelmente os mecanismos de defesas do hospedeiro, contribuindo para a erradicação da infecção pelo microrganismo.

Segundo Held et al. (1995), sub-CIMs de agentes antimicrobianos podem afetar a produção dos componentes da parede celular bacteriana em isolados sensíveis, resultando em sua redução significativa. Este estudo, demonstrou que isolados sensíveis de *E. coli* submetidos a sub-CIMs de quinolônicos apresentaram significantes alterações morfológicas e grandes distúrbios metabólicos, aumentando a susceptibilidade bacteriana a fagocitose por neutrófilos humanos. Estudos realizados com *Helicobacter pylori*, submetidos à sub-CIMs de antibióticos β -lactâmicos, mostraram grandes alterações na membrana e na morfologia celular bacteriana com todos os antibióticos β -lactâmicos testados (DELONEY; NEAL, 1999).

A inibição de PBPs por antibióticos β -lactâmicos não foi relatada apenas em isolados bacterianos sensíveis aos antibióticos testados. Isolados de *Serratia marcescens* com alta e baixa resistência a cefotaxima, ceftazidima e aztreonam, devido à superprodução de β -lactamase cromossômica, tiveram a PBP 3 inibida com alta sensibilidade a estes antibióticos mesmo em concentrações menores ao CIM, concluindo que a superprodução destas enzimas não evitaram a ligação dos antibióticos com seu alvo (GUNKEL; HECHLER; MARTIN, 1991).

3. HIPÓTESE

Antibióticos β -lactâmicos em concentrações clinicamente relevantes interferem *in vitro*, na ultra-estrutura e na produção de CPS de isolados de *K. pneumoniae* obtidos de microbiota, IrAS e infecção na comunidade, apesar de serem portadores de genes de resistência como o *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} ou *bla*_{KPC}.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Determinar a ação de antibióticos β -lactâmicos na ultra-estrutura e na produção de CPS de isolados de *K. pneumoniae* obtidos de microbiota, IrAS e de infecções na comunidade, portadores dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} ou *bla*_{KPC}.

4.2 Específicos

- Determinar a presença e sequência dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{KPC} em isolados de *K. pneumoniae* obtidos de IrAS e de infecções na comunidade.
- Determinar a presença e sequência da região promotora do operon gênico relacionado a produção de cápsula polissacarídica (CPS) nos isolados de *K. pneumoniae* obtidos de IrAS e da comunidade.
- Descrever as alterações ultra-estruturais e morfológicas dos isolados de *K. pneumoniae* obtidos de microbiota e IrAS quando submetidos *in vitro* à concentrações de antibióticos β -lactâmicos clinicamente relevantes.
- Determinar a produção de CPS nos isolados de *K. pneumoniae* obtidos de IrAS e na comunidade.
- Determinar a interferência na produção de CPS nos isolados de *K. pneumoniae* obtidos de IrAS e na comunidade, devido a submissão *in vitro* à concentrações clinicamente relevantes de antibióticos β -lactâmicos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Isolados bacterianos

Para a realização deste estudo foram selecionados 7 isolados de *K. pneumoniae* provenientes de Recife-PE, Brasil. Os isolados K21.1-F e K58.1-F foram obtidos de microbiota em 2003, a partir de fezes de crianças que não apresentavam infecção bacteriana. Estes isolados apresentam resistência ou resistência intermediária a ampicilina e/ou amoxicilina, mas não possuem o gene *bla_{SHV}* (VERAS et al., 2011). Três isolados clínicos de *K. pneumoniae* obtidos em hospitais da rede pública do Recife foram utilizados: K3C, K16R e K652. O perfil de susceptibilidade e a presença dos genes *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}* foi determinado em estudos anteriores nos isolados K3C e K16R (LOPES et al., 2010; VERAS et al., 2011). Estes isolados foram obtidos de infecção urinária de IrAS no ano de 1999 e apresentam resistência a cefotaxima, ceftazidima e ao aztreonam, segundo critérios interpretativos do CLSI 2013.

O isolado K3C possui o gene *bla_{SHV-11}* e o isolado K16R os genes *bla_{SHV-1}* e *bla_{CTX-M2}* (LOPES et al., 2010; VERAS et al., 2011). O isolado K652, primeiramente estudado neste trabalho, foi obtido por pesquisa de vigilância a partir de swab retal de indivíduo sem sintomas clínicos de infecção bacteriana, internado em um hospital da rede pública no ano de 2011. A identificação e o perfil de susceptibilidade deste isolado a diferentes antimicrobianos foi determinado em sistema automatizado VITEK 2 (BioMérieux) e confirmado manualmente frente a cefotaxima, ceftazidima e imipenem (Sigma Aldrich) pelo teste de microdiluição em caldo, utilizando a ATCC de *E. coli* 75922 como controle de qualidade, conforme recomendações do CLSI, 2013.

Os isolados de *K. pneumoniae* K3CM e K11CM foram obtidos a partir de infecção urinária na comunidade e foram gentilmente cedidos por um laboratório de análises clínicas da cidade do Recife-PE, no ano de 2006. Estes isolados apresentam resistência a cefotaxima, ceftazidima e aztreonam pelo teste de microdiluição em caldo, segundo recomendações do CLSI, 2013. O isolado K3CM possui os genes *bla_{SHV-1}* e *bla_{CTX-M2}* e o K11CM o gene *bla_{CTX-M2}* (VERAS et al., 2011; LOPES et al., 2010).

5.2 Extração de DNA

O DNA genômico de todos os isolados de *K. pneumoniae* foi extraído utilizando o *Kit Wizard Genomic DNA purification* (Promega), segundo instruções do fabricante. Um mL de cultura dos isolados cultivados por 18 horas a 37°C foi centrifugado a 14000 rpm por 4 minutos, para posterior remoção do sobrenadante e adição de 600 µL de solução de lise nuclear. A amostra foi ressuspendida e incubada a 80°C por 5 minutos para posterior resfriamento a temperatura ambiente. Posteriormente, três microlitros de solução de RNase foi adicionado na amostra, para incubação a 37° por 60 minutos e resfriamento a temperatura ambiente. Após adição de 200 µL de solução precipitadora de proteína a amostra foi vortexada vigorosamente por 20 segundos, para incubação em gelo por 5 minutos e posterior centrifugação a 14000 rpm por 3 minutos.

O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro recipiente contendo 600 µL de isopropanol para centrifugação a 14000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente com posterior adição de 600µL de etanol a 70% para lavagem do DNA. Após a lavagem, a solução foi centrifugada a 14000 rpm por 2 minutos para retirada do etanol 70%. As amostras de DNA foram secadas para adição de 100 µL da solução reidratante de DNA e armazenamento a -20°C.

5.3 Amplificação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{KPC}

O DNA de cada isolado bacteriano foi utilizado para diferentes objetivos determinados neste trabalho, conforme se segue. A presença do gene *bla*_{TEM} foi pesquisada por PCR em todos os isolados utilizando os primers T1: 5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA -3' e T2: 5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC-3' (MABILAT; GOUSSARD, 1993). O isolado K652 também foi avaliado por PCR quanto a presença dos genes *bla*_{SHV} e *bla*_{KPC} utilizando os primers 5'-GGTTATGCGTTATATTCGCC-3' e 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3' (RASHEED et al., 1997); e KPC1F: 5'- GCTACACCTAGCTCCACCTTC-3' e KPC1R: 5'-ACAGTGGTTGGTAATCCATGC-3' (MOLAND et al., 2002), respectivamente.

As reações de amplificação foram realizadas utilizando um volume total de 25

μl por tubo, compreendendo: 1μl de DNA genômico a 20ng/μl, 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 200 μM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (GeHealthcare), 1,5 mM de MgCl₂, 15 pmol dos primers, além de 2,5 μl de tampão (10x). As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra) do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM/FIOCRUZ, utilizando a seguinte ciclagem: 5 minutos a 96°C para desnaturação, seguido de 35 ciclos consistindo cada ciclo de um minuto a 96°C para desnaturação, um minuto a 57° C (gene *bla*_{TEM}), 64° C (gene *bla*_{KPC}) ou 62° C (gene *bla*_{SHV}), acrescido de um minuto a 72°C para extensão. Após os 35 ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72°C.

5.4 Amplificação de região promotora do operon relacionado a produção de CPS

A determinação da presença da região promotora gênica, para qualquer sorotipo capsular, foi realizada por PCR nos isolados clínicos (K3C, K16R, K652) e de comunidade (K3CM e K11CM) de *K. pneumoniae*, utilizando os primers cpsp: 5'-TCCCAATTGTGACCGAAATC-3' e o cpsprev: 5'-GCTCGCGGCACCAGCTGA-3' (HENNEQUIN; FORESTIER, 2007). Estes primers foram definidos para amplificar uma região altamente conservada entre os diferentes sorotipos capsulares de *K. pneumoniae*. As condições e componentes da PCR foram as mesmas descritas anteriormente, utilizando a temperatura de anelamento de 64° C.

5.5 Eletroforese em gel de agarose

Para a visualização dos resultados 6 μl dos amplicons foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com 2μl de Blue green (LGC Biotecnology) utilizando tampão TBE 0,5x em cuba de eletroforese horizontal por 50 minutos, sob as seguintes condições: 100V, 190mA, 150W. Os produtos da amplificação foram visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador (Transiluminator LOCCUS biotecnologia – L. PIX) e fotodocumentados no Núcleo de Plataformas Tecnológicas – NPT do CPqAM/FIOCRUZ.

5.6 Sequenciamento de DNA

O gene *bla*_{TEM} foi seqüenciado nos isolados clínicos K3C e K16R, devido serem positivos e apresentarem resistência fenotípica as cefalosporinas de terceira geração testadas. Os iniciadores foram os mesmos utilizados para PCR, acrescidos do TEMup21: 5'- TCCCTTTTTTGCGGCATTTC-3' e TEMdown280: 5'- CAGTGAGGCACCTATCTC-3' (JONES et al., 2009). O gene *bla*_{KPC} foi pesquisado e seqüenciado no isolado K652, devido seu perfil fenótipo de resistência aos carbapenêmicos, utilizando os mesmos primers da PCR, acrescidos do KPC A: 5'- CTGTCTTGTCTCTCATGGCC-3'; KPC B: 5'- CCTCGCTGTGCTTGTCATCC-3' (POIREL et al., 2004); KPC F: 5'-GAGCTGAACTCCGCCATC-3'; e KPC R: 5'-TATTTTCCGAGATGGGTGAC-3' (YIGIT et al., 2001). O amplicon da região promotora para produção de CPS foi seqüenciado nos isolados clínicos e de comunidade de *K. pneumoniae*, utilizando os mesmos primers da PCR.

Para seqüenciamento os amplicons foram purificados utilizando o PureLink PCR Micro Kit (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Brevemente, 200 µl de tampão de ligação foi adicionado a 50 µl do amplicon para homogeneização. Posteriormente, a mistura foi inserida na coluna fornecida pelo fabricante para centrifugação, seguida da adição de 650 µl de tampão de lavagem. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a coluna foi re-inserida dentro do tubo de coleta. Após a secagem do material por centrifugação o sobrenadante foi descartado e o DNA foi recuperado pela adição de 10 µl tampão de eluição.

O seqüenciamento dos produtos de PCR foi realizado com amostras de DNA fita dupla, através do método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1992). A análise das seqüências de DNA e o alinhamento múltiplo foi realizada utilizando os programas DNASTAR e BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As seqüências dos genes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-15} e *bla*_{KPC-2} foram depositadas no Genbank database, sob os números de acesso KF906436, KF906435, KF906437, respectivamente. As sequencias das regiões promotoras conservadas dos isolados K3C, K16R, K652, K3CM e K11CM também foram depositadas no Genbank database sob os números de acesso KJ411822, KJ411823, KJ411824, KJ411825, KJ411826.

5.7 Determinação da ultra-estrutura bacteriana por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para determinação do efeito de antibióticos β -lactâmicos na ultra-estrutura bacteriana dos isolados clínicos e de microbiota de *K. pneumoniae*, estes foram submetidos por 18 horas às concentrações clinicamente relevantes dos antibióticos testados em meio caldo Mueller Hinton (Sigma Aldrich) (tabelas 1 e 2) (ADAMIS; PAPAIOANNOU; EVANGELOS, 2004; AHSMAN; WILDSCHUT; TIBBOEL, 2010). A submissão a diferentes antibióticos foi estabelecida de acordo com o perfil fenotípico de resistência dos isolados analisados. Em todos os processamentos foram inclusos um controle de cada isolado nas mesmas condições sem a presença do antibiótico.

As células bacterianas foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH, 7,4 e centrifugadas para fixação em tampão fosfato 0,1M, glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído 4% (Sigma Aldrich). Após as lavagens em tampão fosfato 0,1M, foi realizada a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% para posterior contrastação em bloco utilizando acetato de uranila a 5% (Electron Microscopy Science). Três lavagens foram realizadas para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de acetona de 30 a 100% (Sigma Aldrich). Após a desidratação, foi realizada a infiltração do material e emblocamento em resina Epon 812 (Electron Microscopy Science) para realização de cortes ultrafinos. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Electron Microscopy Science). As amostras foram observadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão ZEISS EM109 no Setor de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE.

5.8 Determinação da produção de CPS por MET

A produção de CPS foi analisada nos isolados clínicos e de comunidade de *K. pneumoniae* sem e com submissão à antibióticos. Os isolados foram crescido em caldo Mueller Hinton por 18 horas a 37° C, contendo concentrações clinicamente relevantes de diferentes antibióticos β -lactâmicos de acordo com o perfil fenotípico de resistência apresentado (tabela 1) (ADAMIS; PAPAIOANNOU; EVANGELOS, 2004; AHSMAN; WILDSCHUT; TIBBOEL, 2010). Em todos os processamentos

foram inclusos um controle de cada isolado nas mesmas condições sem a presença do antibiótico. Devido a constituição polissacarídica da CPS bacteriana, a identificação da produção da CPS foi realizada utilizando a técnica de citoquímica de carboidratos através da marcação com vermelho de rutenio a 0,07%, conforme descrito anteriormente (HELD et al., 1995).

Resumidamente, após o crescimento bacteriano, as células foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH, 7,4 e centrifugadas para posterior fixação em tampão fosfato 0,1M, glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído 4% e 0,07% de vermelho de rutenio (Sigma Aldrich). Após a fixação as células foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% e 0,07% de vermelho de rutenio (Sigma Aldrich). Posteriormente, as células foram lavadas em tampão fosfato 0,1M e desidratadas, utilizando uma série crescente de acetona de 30 a 100% (Sigma Aldrich). Após a desidratação foi realizada a infiltração do material e emblocamento em resina Epon 812 (Electron Microscopy Science), para posterior obtenção de cortes ultrafinos e observação em Microscópio Eletrônico de Transmissão ZEISS EM109 no Setor de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE.

5.9 Análise da morfologia bacteriana pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para determinação do efeito de antibióticos β -lactâmicos na morfologia dos isolados clínicos e de microbiota de *K. pneumoniae*, estes foram submetidos por 18 horas às concentrações clinicamente relevantes de diferentes antibióticos em meio caldo Mueller Hinton (Sigma Aldrich), de acordo com o perfil de susceptibilidade (tabelas 1 e 2) (ADAMIS; PAPAIOANNOU; EVANGELOS, 2004; AHSMAN; WILDSCHUT; TIBBOEL, 2010). Em todos os processamentos foram inclusos um controle de cada isolado nas mesmas condições sem a presença do antibiótico.

As culturas foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH, 7,4 e centrifugadas, para posterior fixação em tampão fosfato 0,1M e glutaraldeído a 2,5% (Sigma Aldrich). A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio a 1% (Sigma Aldrich). Em seguida foram realizadas três lavagens em tampão fosfato 0,1M para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de etanol de 30% a 100% (Sigma

Aldrich). Após a desidratação foi realizado o ponto crítico para a substituição do etanol por dióxido de carbono, obtendo-se a secagem do material para montagem do material seco em suportes metálicos. Em seguida, foi realizada a metalização com cobertura do material por uma fina camada de ouro, para visualização da superfície dos isolados bacterianos no Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM-5600 LV do NPT do CPqAM/FIOCRUZ.

Tabela 1. CIM dos isolados de *K. pneumoniae* obtidos em ambiente hospitalar e de infecção na comunidade frente a cefotaxima, ceftazidima, aztreonam e imipeneme e sub-CIMs utilizados para análise pela MET e MEV.

Isolado ESBL pos.	Cefotaxima (mg/L)			Ceftazidima (mg/L)			Aztreonam (mg/L)		
	CIM	sub-CIM		CIM	sub-CIM		CIM	sub-CIM ^b	
		MET	MEV/MET - Rutenio		MET	MEV/ MET -Rutenio		MET	MEV/ MET - Rutenio
K3C	>256*	64; 32	32	128*	32; 16	32	64*	32; 16	32
K16R	>256*	64; 32	32	32*	16; 8	16	16*	4	4
		MET-Rutenio			MET-Rutenio			MET-Rutenio	
K3CM	>256*		32	64*		32	64*		32
K11CM	>256*		32	64*		32	256*		32
Isolado KPC pos.	Cefotaxima (mg/L)			Ceftazidima (mg/L)			Imipenem (mg/L)		
	CIM	sub-CIM		CIM	sub-CIM ^b		CIM	sub-CIM	
		MET	MEV/MET - Rutenio		MET ^c	MEV/ MET -Rutenio		MET	MEV/ MET - Rutenio
K652	≥256	98	98	≥256	27	27	≥128	16	16

Siglas: CIM: Concentração Inibitória Mínima; sub-CIM: Concentração sub-Inibitória; MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão, processamento rotina; MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura; MET/rutenio: Microscopia Eletrônica de Transmissão processamento com Vermelho de Rutenio 0,07%

*Dados obtidos em outros estudos (LOPES et al., 2010; VERAS et al., 2011).

Tabela 2. CIM dos isolados de *K. pneumoniae* obtidos de microbiota frente a ampicilina e amoxicilina e sub-CIMs utilizados para análise pela MET e MEV.

Isolates	Ampicilina (mg/L)			Amoxicilina (mg/L)		
	CIM	sub-CIM		CIM	sub-CIM	
		MET	MEV		MET	MEV
K58.1-F	16*	0,5; 2; 8	0,5; 8	32*	0,5; 4; 16	0,5; 16
K21.1-F	128*	0,5; 16; 32; 64	16; 32; 64	>128*	0,5; 4; 16; 64; 128	0,5; 16; 128

Siglas: CIM: Concentração Inibitória Mínima; sub-CIM: Concentração sub-Inibitória; MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão; MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura.

*Dados obtidos em outro estudo (VERAS et al., 2011).

6. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto não necessitou ser submetido a análise pelo Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS/UFPE, devido os isolados utilizados neste estudo terem sido obtidos de ambiente hospitalar a partir de IrAS ou por pesquisa de vigilância e de infecções na comunidade, diretamente do laboratório de microbiologia, sem nenhum contato com os pacientes ou prontuários médicos. Os isolados de *K. pneumoniae* obtidos de microbiota são secundários de outro trabalho, anteriormente aprovado pelo CEP/CCS/UFPE (protocolo de número 310/2003-CEP/CCS): “Estudo comparativo de isolados patogênicos e não patogênicos de *Klebsiella pneumoniae* através de métodos moleculares e fenotípicos”, sob coordenação da Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes.

7. RESULTADOS

7.1 ARTIGO 1 - submetido à Revista Microbiology (Apêndice A)

Alterações ultra-estruturais em isolados de *Klebsiella pneumoniae* clínicos e de microbiota portadores dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} ou *bla*_{KPC} quando submetidos a antibióticos β -lactâmicos

Dyana Leal Veras

Categoria de conteúdo: Biologia Celular e Molecular de Micróbios.

Contagem de palavras - resumo: 250.

Contagem de palavras - corpo do texto: 4.496.

Setor de Microscopia Eletrônica/Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami- Universidade Federal de Pernambuco – LIKA/UFPE – Brasil. Postal address: Av. Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária - Recife - PE – Brasil. CEP: 50.670-901.

Departamento de Parasitologia – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ CPqAM-Fiocruz – Brasil. Postal address: Av. Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária - Recife - PE – Brasil. CEP: 50.670-420 Caixa Postal: 7472.

Departamento de Medicina Tropical – Universidade Federal de Pernambuco/UFPE. Postal address: Av. Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária - Recife - PE – Brasil. CEP: 50.670-901.

Departamento de Enfermagem - Faculdade de Ciências Humanas de Olinda – FACHO. Postal address: Rod. PE-015, Jatobá – Olinda – PE – Brasil. CEP: 53.060-

*Endereço para correspondência:

Dyana Leal Veras

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/Fiocruz

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

CEP: 50.670-420 Caixa Postal: 7472

Telefone: +55 81 2101-2643/2101-2542. E-mail: dleal@cpqam.fiocruz.br

Resumo

Klebsiella pneumoniae é um dos mais comuns microrganismos com perfil multidroga-resistente, o que dificulta a escolha da terapia antimicrobiana devido a redução de opções terapêuticas. Assim, como alternativa, novos estudos devem ser desenvolvidos, onde os antibióticos antigos e descartados devem ser novamente investigados. Sabendo que os antibióticos β -lactâmicos são os mais comuns agentes antibacterianos prescritos, o objetivo deste estudo foi caracterizar os efeitos ultra-estruturais causados por estes antibióticos em isolados de *Klebsiella pneumoniae*. Três isolados clínicos de *K. pneumoniae* foram selecionados para o estudo com perfil de resistência a cefalosporinas de terceira geração, aztreonam e/ou imipenem, com diferentes genes de resistência para ESBL ou KPC. Dois isolados de *K. pneumoniae* obtidos de microbiota foram também analisados, ambos resistentes a amoxicilina e ampicilina. De acordo com o perfil de susceptibilidade, os isolados clínicos foram submetidos a sub-CIMs de cefotaxima, ceftazidima, aztreonam e imipenem e os de microbiota a ampicilina e amoxicilina, para análise pela microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Os isolados de *K. pneumoniae* demonstraram diferentes alterações morfológicas e ultra-estruturais após submissão aos β -lactâmicos testados em diferentes concentrações, tais como filamentação celular, perda de material citoplasmático e deformação dos septos de divisão. Nossos resultados demonstram que isolados de *K. pneumoniae* portadores de diferentes genes codificantes para β -lactamases, apresentam alterações celulares quando submetidos a diferentes antibióticos β -lactâmicos, sugerindo que estes possuem ação residual *in vitro* nos isolados analisados, suportando a idéia de que a

produção de ESBL e KPC por isolados de *K. pneumoniae* não são capazes de evitar completamente a interação de antibióticos β -lactâmicos com seu alvo.

Palavras chave: *Klebsiella pneumoniae*, genes de resistência, ESBL, KPC, microscopia eletrônica.

Introdução

Klebsiella pneumoniae é um dos mais comuns microrganismos gram-negativos multidroga-resistentes (MDR) encontrado no mundo todo, sendo responsável por alta morbidade e mortalidade tanto em hospitais como em outras unidades de saúde (Mammìna *et al.*, 2012).

Os antibióticos β -lactâmicos são os agentes antibacterianos mais comumente prescritos devido a alta eficiência de seu mecanismo de ação e baixa toxicidade (Haeggman *et al.*, 2004). As PBPs (Proteínas Fixadoras de Penicilina), constituem alvos letais dos β -lactâmicos em bactérias sensíveis e sua inibição leva a degradação da parede celular bacteriana e a eventual lise celular (Stefanova *et al.*, 2003).

Cada PBP tem um papel específico na proliferação e na manutenção da morfologia bacteriana, onde o bloqueio da PBP-1 leva a rápida lise bacteriana, da PBP-2 a formação de células esféricas e da PBP-3 a formação de longos filamentos, causados pela incapacidade de formação de septos de divisão após a duplicação da massa celular bacteriana (Buijs *et al.*, 2008, Horii *et al.*, 1998, Jackson & Kroop, 1992). Vários trabalhos relatam alterações morfológicas bacterianas diferenciadas, causadas por sub-CIMs (sub-Concentrações Inibitórias Mínimas) de cefalosporinas

de terceira geração e carbapenêmicos em isolados sensíveis de várias espécies bacterianas, devido a diferenças na afinidade dos β -lactâmicos às PBPs (Buijs et al., 2008, Horii et al., 1998, Jackson & Kroop, 1992).

A produção de β -lactamases é o mais comum e importante mecanismo de resistência em bactérias patogênicas contra antibióticos β -lactâmicos (Haeggman et al., 2004). As β -lactamases clássicas são enzimas capazes de inativar penicilinas e cefalosporinas de espectro estreito antes de atingirem seu alvo (Robin et al., 2005). A maioria dos isolados de *K. pneumoniae* carrega o gene para β -lactamase cromossômica de classe A SHV-1, que possui atividade limitada contra ampicilina, não hidrolizando antibióticos β -lactâmicos de amplo-espectro (Nelson et al., 2003). A presença deste gene foi anteriormente estudada em isolados de *K. pneumoniae* oriundos da microbiota de indivíduos sem infecção bacteriana (Veras et al., 2011).

A introdução na prática clínica de oximino-cefalosporinas para o tratamento de infecções por bactérias gram-negativas foi brevemente seguida pelo surgimento das β -lactamases de amplo espectro (ESBLs) derivadas das β -lactamases clássicas SHV-1, TEM-1 e TEM-2, conferindo resistência a cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos como o aztreonam (Haeggman et al., 2004). Atualmente, mais de 180 variantes do gene *bla*_{SHV} e mais de 210 do *bla*_{TEM} já foram relatadas (Jacoby & Bush, 2013). Outro grupo de ESBL, que apresenta alto perfil de hidrólise frente a cefotaxima com menos que 40% de identidade com as enzimas SHV e TEM, é o grupo de enzimas CTX-M, amplamente encontrada em diferentes espécies da família Enterobacteriaceae, incluindo *K. pneumoniae* (Saladin et al., 2002).

O tratamento de infecções por isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBLs fica limitado ao uso de poucos antibióticos disponíveis, sendo frequentemente os carbapenêmicos a última linha de tratamento efetivo contra estas

infecções (Lascols *et al.*, 2013). No entanto, a produção da carbapenemase de classe A, KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), uma β -lactamase de amplo espectro, tem sido relacionada como a principal forma de resistência aos carbapenêmicos nesta espécie bacteriana, sendo relatadas 15 variantes, com disseminação em diferentes partes do mundo (Jacoby & Bush, 2013).

A produção destas β -lactamases por isolados clínicos de *K. pneumoniae* tem representado um grande problema em vários países, dificultando as opções terapêuticas disponíveis para tratamento de infecções por esta espécie bacteriana.

O aumento da prevalência de bactérias resistentes a antibióticos ameaça uma era pós-antibiótico iminente, caracterizada pela diminuição da eficácia de antibióticos comuns e aplicação rotineira de abordagens terapêuticas complementares para tratamento das infecções bacterianas (Cress *et al.*, 2013). Portanto, novos estudos devem ser desenvolvidos, onde os antibióticos antigos e descartados, ou mesmo rejeitados, devem ser reinvestigados, reaproveitados e usados quando necessário (Bush *et al.*, 2011).

Neste pensamento, alguns estudos tentaram demonstrar a ação *in vitro* e *in vivo* de associações terapêuticas de antibióticos β -lactâmicos e aminoglicosídeos em isolados de *K. pneumoniae* MDR, visando a obtenção de novas opções para tratamento de infecções por esta espécie bacteriana (Hirsch *et al.*, 2013). No entanto, nenhum estudo demonstrou a alteração induzida por diferentes antibióticos β -lactâmicos, na estrutura celular bacteriana de isolados de *K. pneumoniae* MDR.

Isolados de *K. pneumoniae* resistentes a cefotaxima quando submetidos a sub-CIMs deste antibiótico, demonstraram danos na superfície celular, além de filamentação por processo adaptativo dose-dependente, devido ao ambiente

estressante pela presença do antibiótico, o que poderia contribuir para efeitos terapêuticos (Rajeshwari et al., 2009).

No entanto, a modificação da morfologia bacteriana devido a submissão a antibióticos β -lactâmicos, foi associada em vários estudos com o aumento da liberação de endotoxinas livres, o que poderia causar danos ao hospedeiro (Bujis et al., 2008, Horii et al., 1998, Jackson & Kroop, 1992).

Infelizmente, ainda é escasso o conhecimento sobre os efeitos causados por antibióticos β -lactâmicos na estrutura celular bacteriana de isolados de *K. pneumoniae* MDR, portadores de importantes genes de resistência como *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC}, assim como o efeito destes antibióticos em isolados obtidos de microbiota de indivíduos sem infecção bacteriana. Portanto, o objetivo deste estudo foi caracterizar os efeitos morfológicos e ultra-estruturais causados por antibióticos β -lactâmicos amplamente utilizados na clínica médica, em isolados de *K. pneumoniae* patogênicos e não patogênicos, portadores de genes codificantes de β -lactamases clássicas, ESBL e KPC.

Materiais e Métodos

Isolados bacterianos

Para a realização deste estudo foram selecionados 5 isolados de *K. pneumoniae* provenientes de Recife-PE, Brasil (Tabelas 1 e 2). Os isolados K21.1-F e K58.1-F foram obtidos de microbiota a partir de fezes de crianças que não apresentavam infecção bacteriana. Estes isolados apresentam resistência ou resistência intermediária a ampicilina e/ou amoxicilina, mas não possuem o gene

*bla*_{SHV} (Tabela 1) (Veras *et al.*, 2011). Três isolados clínicos de *K. pneumoniae* obtidos em hospitais da rede pública do Recife foram utilizados: K3C, K16R e K652. O perfil de susceptibilidade e a presença dos genes *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} foi determinado em estudos anteriores nos isolados K3C e K16R (Veras *et al.*, 2011, Lopes *et al.*, 2010), os quais apresentaram resistência a cefotaxima, ceftazidima e ao aztreonam, segundo critérios interpretativos do CLSI, 2013.

O isolado K3C possui o gene *bla*_{SHV-11} e o isolado K16R os genes *bla*_{SHV-1} e *bla*_{CTX-M2} (Veras *et al.*, 2011, Lopes *et al.*, 2010). O isolado K652, primeiramente estudado neste trabalho, foi obtido por pesquisa de vigilância a partir de swab retal de indivíduo sem sintomas clínicos de infecção bacteriana, internado em um hospital da rede pública no ano de 2011. A identificação e o perfil de susceptibilidade deste isolado a diferentes antimicrobianos foi determinado em sistema automatizado VITEK 2 (BioMérieux) e confirmado manualmente frente a cefotaxima, ceftazidima e imipenem (Sigma Aldrich) pelo teste de microdiluição em caldo, segundo recomendações do CLSI, 2013.

Extração de DNA e PCR

O DNA genômico dos isolados de *K. pneumoniae* foi extraído utilizando o *Kit Wizard Genomic DNA purification* (Promega), segundo instruções do fabricante. A presença do gene *bla*_{TEM} foi pesquisada por PCR nos isolados da microbiota e nos três isolados clínicos utilizando os primers T1: 5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA -3' e T2: 5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC-3' (Mabilat & Goussard, 1993). O isolado K652 também foi avaliado por PCR quanto a presença dos genes *bla*_{SHV} e *bla*_{KPC} utilizando os primers 5'-GGTTATGCGTTATATTCGCC-3' e 5'-

TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3 (Rasheed *et al.*, 1997) e KPC1F: 5'-GCTACACCTAGCTCCACCTTC-3' e KPC1R: 5'-ACAGTGGTTGGTAATCCATGC-3' (Moland *et al.*, 2002), respectivamente.

Sequenciamento de DNA

O sequenciamento dos produtos de PCR dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{KPC}, foi realizado utilizando seqüenciador automático Applied Biosystems - Hitashi, após purificação dos amplicons com o PureLink PCR Micro Kit (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. O gene *bla*_{TEM} foi seqüenciado nos isolados K3C e K16R, devido apresentarem resistência fenotípica as cefalosporinas de terceira geração testadas. Apenas o gene *bla*_{KPC} foi seqüenciado no isolado K652, devido este apresentar resistência fenotípica aos carbapenêmicos. Os iniciadores foram os mesmos utilizados para PCR, acrescidos do TEMup21: 5'-TCCCTTTTTTGCGGCATTTC-3' e TEMdwn280: 5'-CAGTGAGGCACCTATCTC-3' (Jones *et al.*, 2004), para o gene *bla*_{TEM}; e KPC F: 5'-GAGCTGAACTCCGCCATC-3'; e KPC R: 5'-TATTTTCCGAGATGGGTGAC-3' (Yigit *et al.*, 2001), para o gene *bla*_{KPC}.

A análise da seqüência do DNA e o alinhamento múltiplo foi realizada utilizando os programas DNASTar e BLAST. As seqüências dos genes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-15} e *bla*_{KPC-2} foram depositadas no Genbank database sob os números de acesso KF906436, KF906435 e KF906437, respectivamente.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a análise da ação dos antibióticos nos isolados de *K. pneumoniae*, estes foram submetidos a diferentes sub-CIMs de ampicilina, amoxicilina, ceftazidima, cefotaxima, aztreonam e imipenem (Sigma Aldrich), de acordo com a origem e perfil de susceptibilidade de cada isolado, utilizando concentrações relevantes clinicamente (tabelas 1 e 2) (Adamis *et al.*, 2004, Ahsman *et al.*, 2010). Em todos os processamentos foram incluídos um controle do isolado nas mesmas condições e diluições, sem a presença do antibiótico. Os isolados foram cultivados por 18 horas a 37° C (310.15K). Após o crescimento as células bacterianas foram centrifugadas e fixadas com glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% (Sigma Aldrich). As células foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% e posteriormente contrastadas em acetato de uranila a 5% (Electron Microscopy Science). A desidratação foi realizada utilizando acetona (Sigma Aldrich) com posterior infiltração e emblocamento do material em resina epon 812 (Electron Microscopy Science). As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM109.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os isolados de *K. pneumoniae* foram submetidos aos antimicrobianos, utilizando as concentrações e critérios descritos anteriormente (tabelas 1 e 2). Após o crescimento, as células bacterianas foram centrifugadas gentilmente e fixadas com glutaraldeído 2,5% (Sigma Aldrich). A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% (Electron Microscopy Science) com posterior desidratação utilizando etanol (Sigma Aldrich). Após a desidratação foi realizada a secagem do material para metalização e visualização das células bacterianas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5600 LV.

Resultados

Susceptibilidade aos antimicrobianos

O isolado de *K. pneumoniae* K652 apresentou resistência a todos os antibióticos testados pelo sistema automatizado VITEK 2 (ampicilina, ampicilina/sulbactam, aztreonam, cefalotina, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacino, ertapenem, gentamicina, imipenem, meropenem, piperacilina/tazobactam), com exceção da amicacina e tigeciclina. A realização do teste de microdiluição em caldo confirmou a resistência deste isolado frente a cefotaxima, ceftazidima e imipenem, com CIMs $\geq 256 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Presença dos genes bla_{SHV} , bla_{TEM} e bla_{KPC}

A análise por PCR identificou a presença do gene bla_{TEM} nos três isolados clínicos de *K. pneumoniae* e no isolado K21.1-F de microbiota. Adicionalmente, os genes bla_{SHV} e bla_{KPC} também foram identificados por PCR no isolado K652 de *K. pneumoniae*.

Seqüenciamento dos genes bla_{TEM} e bla_{KPC}

O gene bla_{TEM-1} foi identificado no isolado K16R de *K. pneumoniae* que também possui o gene bla_{CTX-M2} (Lopes *et al.* 2010). O gene bla_{TEM} encontrado no isolado K3C apresenta mudança de nucleotídeos em relação ao gene bla_{TEM-1} na posição 512 G→A e 914 G→A, levando a substituição de Glu-104→Lys e Gly-

238→Ser. As substituições de aminoácidos relatadas foram encontradas anteriormente para o gene *bla*_{TEM-15}. (Tristram *et al.*, 2008, Sirot *et al.*, 1997). O gene *bla*_{KPC} identificado no isolado K652 de *K. pneumoniae* apresenta 100% de similaridade com o *bla*_{KPC-2} publicado no Genbank database sob o numero de acesso AY034847 (Smith Moland *et al.*, 2003).

Análises ultra-estruturais e morfológicas

As células dos isolados de *K. pneumoniae* controle, analisadas sem submissão a antibióticos β -lactâmicos, apresentaram morfologia conservada com parede celular íntegra e conteúdo citoplasmático de aspecto eletrondenso através da análise pela MET, sendo possível observar a presença de ribossomos e material genético distribuídos pelo citoplasma bacteriano. As células em processo de divisão apresentaram formação de septos sem irregularidades, Fig. 1(a), Fig. 2(a) e Fig.3(a). A análise pela MEV demonstrou morfologia bacteriana conservada em forma de bastão e comprimento celular em média entre 1,5 a 3 μ m, Fig. 4(a-b), Fig. 5(a) e 6(a).

Isolado K16R

Apesar do isolado K16R apresentar resistencia a cefotaxima, ceftazidima e ao aztreonam e de possuir os genes *bla*_{SHV-1}, *bla*_{TEM-1} e *bla*_{CTX-M2}, a submissão deste isolado a sub-CIMs destes antimicrobianos provocou eventos celulares diferenciados das células controle. Apos a submissão à cefotaxima nas concentrações de 32 e 64 μ g ml⁻¹, foram observadas células com aumento do espaço periplasmático em toda a extensão celular com maior pronunciamento na extremidade das células, sugerindo

diminuição ou retração do conteúdo citoplasmático celular, Fig. 2(b). Não foram observadas alterações morfológicas e no tamanho celular significativas na análise pela MEV, Fig. 5(b).

A submissão do isolado K16R as concentrações de 8 e 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ceftazidima permitiu a identificação de alterações morfológicas e na organização celular pela MET e MEV, onde várias células alongadas foram visualizadas. Pela MET pode-se observar que este evento ocorria devido a divisões celulares não finalizadas, identificadas pela presença de vários septos de divisão consecutivos sem finalização. Algumas células apresentaram ainda espaços celulares membranares no interior do citoplasma bacteriano, apresentando conteúdo citoplasmático idêntico ao restante da célula com ribossomos e material genético distribuído igualmente, Fig. 2(c-e). Este evento sugere que a divisão celular não ocorreu possibilitando a formação de compartimentos membranares no interior das células bacterianas. Pôde-se observar ainda desorganização estrutural da continuidade da membrana citoplasmática de algumas células e diminuição da quantidade de citoplasma bacteriano. Através da MEV foi possível identificar células com mais de 15 μm de comprimento, Fig. 5(c).

Apos a submissão do isolado K16R a 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de aztreonam algumas células apresentaram grandes espaços eletróluscentes no citoplasma bacteriano com diminuição da massa citoplasmática, Fig. 2(f-h). Não foram identificadas alterações morfológicas ou no tamanho celular pela MEV, Fig. 5(d).

Isolado K3C

O isolado K3C de *K. pneumoniae* também possui resistência fenotípica a cefotaxima, ceftazidima e ao aztreonam, e possui os genes *bla*_{SHV-11} e *bla*_{TEM-15}. Após a submissão deste isolado a 32 e 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cefotaxima algumas células apresentaram diminuição do material citoplasmático com formação de compartimentos membranares no interior das células, os quais apresentam material interno contendo ribossomos. Estas células apresentaram desorganização da membrana citoplasmática. Várias células também continham em seu citoplasma grande número de estruturas eletrônicas não membranares, próximo a membrana celular, em ambas as concentrações testadas, Fig. 1(b-c). Nenhuma alteração morfológica foi identificada pela MEV, Fig. 6(b).

Várias células filamentosas foram visualizadas após a submissão do isolado K3C a 16 e 32 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ceftazidima, através da MET e MEV. Pela MET, pode-se observar que o alongamento celular era acompanhado de perda ou retração do material citoplasmático no meio da célula em divisão ou na extremidade das células já separadas. A presença de um grande espaço eletrônolúcente entre a membrana citoplasmática e parede celular destas células destaca a presença de compartimentos celulares membranares contendo material citoplasmático, Fig. 1(d). Através da MEV foi possível observar células com até 18 μm de comprimento, Fig. 6(c).

Os eventos celulares induzidos pelo aztreonam neste isolado, nas concentrações de 16 e 32 $\mu\text{g ml}^{-1}$, foram discretos, com algumas células apresentando grande número de espaços eletrônolúcentes não membranares no citoplasma bacteriano, semelhante ao encontrado após o tratamento com cefotaxima, Fig. 1(e). A maioria das células, no entanto, apresentou conservação da

morfologia com preservação da membrana citoplasmática e parede celular. Não existiram mudanças morfológicas observadas pela MEV, Fig. 6(d).

Isolado K652

O isolado K652 de *K. pneumoniae* possui o gene *bla*_{KPC-2} e apresenta alta resistência fenotípica a carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração. A submissão deste isolado tanto a ceftazidima a 27 µg ml⁻¹, como ao imipenem a 16 µg ml⁻¹, provocou filamentação celular em análise realizada pela MEV, sendo possível observar células com mais de 50 µm de comprimento, Fig. 4(e-i). O número de células alongadas foi aparentemente maior com a submissão ao imipenem em relação a ceftazidima, Fig. 3(d-h). A análise pela MET do isolado K652 submetido a estes antibióticos, demonstrou que a maioria das células apresentavam formação de septos de divisão consecutivos, sem finalização do processo de divisão. Muitas células também apresentaram alongamento e desorganização da membrana citoplasmática e parede celular no local da divisão celular, proporcionando um aspecto elástico a estes componentes celulares.

Através da MEV pode-se observar vários bastonetes originando células não desenvolvidas em forma de cocos após a submissão do isolado K652 a 98 µg ml⁻¹ de cefotaxima, Fig. 4(c-d). A MET confirmou algumas células esféricas sendo formadas a partir de células em forma de bastonetes com alteração na densidade do citoplasma bacteriano, Fig. 3(b-c).

Isolados K58.1-F e K21.1-F

Os resultados da análise através da MET e MEV dos isolados de *K. pneumoniae* oriundos de microbiota, após submissão a amoxicilina e ampicilina, foram bastante semelhantes aos isolados obtidos em ambiente hospitalar, quando submetidos a cefotaxima e ao aztreonam.

O isolado K58.1-F, que apresenta resistência fenotípica a amoxicilina e resistência intermediária a ampicilina, quando exposto aos sub-CIMs destes antibióticos (tabela 2), apresentou pela MET, espaços eletróluscentes aumentados na extremidade das células em comparação com o controle, sugerindo diminuição do conteúdo citoplasmático. Grande quantidade de espaços eletróluscentes e estruturas eletrondensas não membranares também foram identificadas no citoplasma bacteriano de várias células, Fig. 7(b-c). Estes eventos celulares foram aumentados de acordo com a maior concentração utilizada de cada droga, demonstrando uma correlação dose-dependente.

Apesar do isolado K21.1-F apresentar CIMs maiores para amoxicilina e ampicilina em relação ao isolado K58.1-F, a análise pela MET após submissão aos sub-CIMs destes antibióticos, demonstrou resultados semelhantes entre os dois isolados. Foram identificadas grande quantidade de espaços eletróluscentes e estruturas eletrondensas não membranares no citoplasma bacteriano de várias células do isolado K21.1-F, mesmo na concentração mais baixa testada ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$), Fig. 7(a). Foi observada simultaneamente, várias células com formação irregular de septos durante a divisão bacteriana, sem retração ou perda do conteúdo citoplasmático mesmo em concentrações mais elevadas, Fig. 7. A análise através da MEV não demonstrou alterações significativas em nenhuma concentração dos antibióticos testados nos isolados K21.1-F e K58.1-F.

Discussão

A produção de β -lactamases é um dos principais mecanismos de resistência entre isolados da família Enterobacteriaceae, especialmente ESBL e KPC, as quais são frequentemente encontradas em isolados clínicos de *K. pneumoniae*, conferindo fenótipo resistente aos principais β -lactâmicos utilizados na clínica médica.

Os genes *bla*_{TEM-15}, *bla*_{CTX-M2} e *bla*_{KPC-2} encontrados respectivamente nos isolados K3C, K16R e K652, codificam enzimas do tipo ESBL e carbapenemase. Estes genes foram anteriormente relatados em diferentes espécies bacterianas (Monteiro *et al.*, 2009, Peirano *et al.*, 2009, Sirot *et al.*, 1997). A mudança de Glu→Lys na posição 104 e Gly→Ser na posição 238 do gene *bla*_{TEM-15} é conhecidamente favorável ao aumento da fixação do substrato e do sitio ativo enzimático, determinando uma enzima com afinidade e eficiência catalítica aumentada para oxymino cephalosporins (Sirot *et al.*, 1997).²⁸ A ESBL CTX-M pertencente ao grupo filogenético CTX-M2 é uma das enzimas CTX-M type mais encontrada em isolados de Enterobacteriaceae no Brasil (Peirano *et al.*, 2009), apresentando alto poder de hidrólise frente a cefalosporinas de terceira geração, especialmente a cefotaxima.

As β -lactamases do tipo KPC hidrolisam eficientemente penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e aztreonam, sendo inibidos pelo ácido clavulânico e tazobactam (Peirano *et al.*, 2009). O isolado K652 possui o gene de resistência *bla*_{KPC-2} e apresenta perfil fenotípico de resistencia a cefalosporinas de terceira geração e carbapenêmicos. No Brasil, o gene *bla*_{KPC-2} foi primeiramente detectado em isolados de *K. pneumoniae* obtidos de indivíduos internados em hospitais do Recife-PE (Monteiro *et al.*, 2009). Desde então, outros estudos demonstraram a

presença deste gene em isolados de *K. pneumoniae* obtidos em vários estados do Brasil (Peirano *et al.*, 2009, Monteiro *et al.*, 2009).

Casos de infecções por isolados produtores destas enzimas trazem bastante preocupação quanto à antibioticoterapia mais indicada. Isto porque o crescimento bacteriano muitas vezes não se altera, não ocorrendo, morte celular devido a submissão aos β -lactâmicos. Neste contexto, este estudo propôs demonstrar o efeito *in vitro* do imipenem, penicilinas, cefaloporinas de terceira geração e do aztreonam em isolados de *K. pneumoniae* MDR e de microbiota, obtidos de indivíduos em diferentes condições clínicas. Esta variabilidade permitiu a análise dos efeitos de antibióticos β -lactâmicos em isolados com perfis de resistência genéticos e fenotípicos distintos, capazes de assumir diferentes evoluções frente organismos hospedeiros.

A submissão dos isolados K3C, K16R e K652 às diferentes concentrações de ceftazidima e do isolado K652 ao imipenem, promoveu filamentação celular em todos os isolados analisados, com formação de vários septos consecutivos e desorganização da membrana e parede celular em várias células. A submissão de isolados sensíveis de *P. aeruginosa* a sub-CIMs de imipenem e ceftazidima leva a inibição de PBP-2 e PBP-3, respectivamente (Jackson & Kroop, 1992). A ligação de antibióticos a PBP-3 inibe a formação de septos predispondo a formação de filamentos, devido a inabilidade da célula concluir o processo de divisão após duplicação da massa bacteriana (Buijs *et al.*, 2008, Horii *et al.*, 1998).

Isolados de *Serratia marcescens* com alta e baixa resistência a cefotaxima, ceftazidima e aztreonam, devido à superprodução de β -lactamase cromossômica, tiveram a PBP 3 inibida com alta sensibilidade a estes antibióticos mesmo em concentrações menores ao CIM, concluindo que a superprodução destas enzimas

não evitaram a ligação dos antibióticos com seu alvo (Gunkel *et al.*, 1991). Neste estudo, a presença de filamentos bacterianos e a desorganização celular apresentada pelos isolados de *K. pneumoniae* após a submissão à ceftazidima e imipenem, nos leva a acreditar que houve ligação e inibição de PBPs essenciais ao processo de divisão celular por estes antibióticos, apesar da produção de ESBLs e KPC.

Em estudo realizado por Rajeshwari *et al.* (2009), a formação de filamentos bacterianos em isolados de *K. pneumoniae* resistentes, devido a submissão a cefotaxima, foi considerada estressante por promover alongamento e deformação das células bacterianas. Este evento foi atribuído à provável inibição da síntese de mucopeptídeo, devido fixação e inibição de PBPs pelo antibiótico, o que poderia diminuir a estabilidade da parede celular bacteriana, predispondo as células a lise (Rajeshwari *et al.*, 2009). Outros estudos demonstram, no entanto, que a formação de filamentos bacterianos aumentam a liberação de endotoxinas, sendo considerado um risco adicional durante o tratamento empírico de infecções severas, por predispor o aumento do processo inflamatório na sepse (Buijs *et al.*, 2008, Jackson & Kroop, 1992).

Neste trabalho, a submissão dos isolados de origem hospitalar a cefotaxima não foi capaz de promover filamentação celular, mas sim aumento do espaço periplasmático com estruturas membranares contendo material citoplasmático em várias células. Adicionalmente, o isolado K652 submetido a cefotaxima apresentou mudanças morfológicas, com células de tamanho reduzido e esféricas.

Devido à grande necessidade de opções terapêuticas eficientes para o tratamento de isolados bacterianos MDR, novas combinações terapêuticas têm sido testadas. Recentemente Hirsch *et al.* realizaram estudo que demonstrou que o

meropenem e a amicacina em combinação são capazes de inibir *in vitro* e *in vivo* o crescimento de isolados resistentes de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2 e KPC-3 (Hirsch *et al.*, 2013). No presente estudo, pode-se determinar que o imipenem e a ceftazidima sozinhos foram capazes de promover alterações celulares *in vitro* que incluem perda de material citoplasmático, filamentação e desorganização da membrana e parede celular no local de divisão. A compreensão do efeito de antibióticos sozinhos frente isolados de *K. pneumoniae* MDR é de extrema importância, para que possamos entender como a elaboração de associações terapêuticas podem contribuir efetivamente para o tratamento de infecções por estes isolados.

Cada antibiótico β -lactâmico tem uma afinidade específica para um tipo de PBP, onde o aztreonam, a cefotaxima e a ceftazidima em baixas concentrações, inibem a PBP3, resultando na formação de filamentos, e em altas concentrações estes antibióticos inibem a PBP1, resultando em morte de células bacterianas sensíveis a estes antibióticos (Buijs *et al.*, 2008).

No entanto, em modelo de sepse em murinos, a afinidade do antibiótico β -lactâmico às diferentes PBPs não determinou a formação de filamentos em isolados sensíveis de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* submetidos a ceftazidima, mas sim o esquema de dosagem utilizado para o tratamento da infecção com este antibiótico (Buijs *et al.*, 2007), provavelmente devido oscilações dos níveis plasmáticos. Aparentemente, em nosso trabalho, os isolados resistentes de *K. pneumoniae* submetidos a concentrações de antibióticos β -lactâmicos relevantes clinicamente, tem resposta similar a de células sensíveis em baixas concentrações destes antibióticos.

Deloney & Schiller (1999), utilizando isolados sensíveis de *Helicobacter pylori* submetidos à sub-CIMs de antibióticos β -lactâmicos, incluindo ampicilina e aztreonam, demonstraram que as células bacterianas tornavam-se filamentosas quando submetidas ao aztreonam e esféricas após submissão a outros β -lactâmicos. Os dados apresentados neste trabalho mostram que o aztreonam não foi capaz de induzir filamentação celular nos isolados clínicos testados, mas sim o aparecimento de espaços eletróluscentes que sugeriam perda de conteúdo citoplasmático, assim como a ampicilina e amoxicilina no isolados de microbiota.

Apesar dos antibióticos β -lactâmicos testados terem capacidade de causarem alterações nos isolados de *K. pneumoniae* utilizados neste estudo, obviamente, esses antibióticos não são capazes de interferir com a sobrevivência dos isolados com fenótipo resistente, talvez devido a incapacidade de inibirem mais de um tipo de PBP essencial ao crescimento bacteriano, requisito fundamental para o efeito bactericida de antibióticos β -lactâmicos (Gunkel *et al.*, 1991).

Nossos resultados mostram que isolados de *K. pneumoniae* portadores de diferentes β -lactamases e resistentes a diferentes antimicrobianos β -lactâmicos podem sofrer alterações ultra-estruturais quando submetidos a sub-CIMs de drogas β -lactâmicas, sugerindo que estes possuem ação residual *in vitro* nos isolados analisados, suportando a idéia de que a produção de ESBL e KPC por isolados de *K. pneumoniae* não são capazes de evitar completamente a interação de antibióticos β -lactâmicos com seu alvo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em

Insumos para Saúde – PDTIS da Fundação Oswaldo cruz/FIOCRUZ e ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ, particularmente a Msc. Viviane Carvalho e Dra. Cássia Docena, pela assistência técnica.

Competição de Interesses

Os autores declaram não ter competição de interesses.

Referências

1. Adamis, G, Papaioannou, M. G., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Gargalianos, P., Kosmidis, J. & Giamarellou, H. (2004). Pharmacokinetic interactions of ceftazidime, imipenem and aztreonam with amikacin in healthy volunteers. *Int J Antimicrob Agents* **23**, 2, 144-149.
2. Ahsman, M. J., Wildschut, E. D., Tibboel, D. & Mathot, R. A. (2010). Pharmacokinetics of cefotaxime and desacetylcefotaxime in infants during extracorporeal membrane oxygenation. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 5, 1734-1741.
3. BLAST. Basic Local Alignment Search Tool
[<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]
4. Buijs, J., Dofferhoff, A. S., Mouton, J. W. & Van der Meer, J.W. (2007). Continuous administration of PBP-2- and PBP-3-specific β -lactams causes higher cytokine responses in murine *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* sepsis. *J Antimicrob Chemother* **59**, 5, 926-933.
5. Buijs, J., Dofferhoff, A. S. M., Mouton, J. W., Wagenvoort, J. H. & Van der Meer, J. W. (2008). Concentration-dependency of β -lactam-induced filament formation in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **14**, 4, 344-349.
6. Bush, K., Courvalin, P., Dantas, G., Davies, J., Eisenstein, B., Huovinen, P., Jacoby, G. A., Kishony, R., Kreiswirth, B. N. & other authors. (2011). Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* **9**, 12, 894-6.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement*. Wayne, PA: CLSI: Document M100-S15.

8. Cress, B. F., Englaender, J. A., He, W., Kasper, D., Linhardt, R. J. & Koffas, M. A. (2013). Masquerading microbial pathogens: Capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. *FEMS Microbiol Rev.* In press.
9. Deloney, C. R. & Schiller, N. L. (1999). Competition of various β -lactam antibiotics for the major penicillin-binding proteins of *Helicobacter pylori*: antibacterial activity and effects on bacterial morphology. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 11, 2702-2709.
10. Gunkel, A. G., Hechler, U. & Martin, H. H. (1991). State of penicillin-binding proteins and requirements for their bactericidal interaction with β -lactam antibiotics in *Serratia rnarcescens* highly resistant to extended-spectrum β -lactams. *J Gen Microbial* **137**, 2, 243–252.
11. Haeggman, S., Lofdahl, S., Paauw, A., Verhoef, J. & Brisse, S. (2004). Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 7, 2400-2408.
12. Hirsch, E. B., Guo, B., Chang, K., Cao, H., Ledesma, K. R., Singh, M. & Tam, V. H. (2013). Assessment of antimicrobial combinations for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase–producing *K. pneumoniae*. *J Infect Dis* **207**, 5, 786-793.
13. Horii, T., Kobayashi, M., Sato, K., Ichiyama, S. & Ohta, M. (1998). An in-vitro study of carbapenem-induced morphological changes and endotoxin release in clinical isolates of gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother* **41**, 4, 435-442.
14. Jackson, J. J. & Kropp, H. (1992). β -lactam antibiotic-induced release of free endotoxin: in vitro comparison of penicillin-binding protein (PBP) 2-specific imipenem and PBP 3-specific ceftazidime. *J Infect Dis* **165**, 6, 1033-1041.
15. Jacoby, G. & Bush, K. (2013). β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant

Enzymes [<http://www.lahey.org/studies>].

16. Jones, C. H., Ruzin, A., Tuckman, M., Visalli, M. A., Petersen, P.J. & Bradford, P. A. (2009). Pyrosequencing using the single-nucleotide polymorphism protocol for rapid determination of TEM- and SHV-type extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates and identification of the novel β -lactamase genes *bla*_{SHV-48}, *bla*_{SHV-105}, and *bla*_{TEM-155}. *Antimicrob Agents and Chemother* **53**, 3, 977–986.
17. Lascols, C., Peirano, G., Hackel, M., Laupland, K. B. & Pitout, J. D. (2013). Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob Agents and Chemother* **57**, 1, 130-136.
18. Lopes, A. C. S., Veras, D. L., Lima, A. M. S., Melo, R. C. A. & Ayala, J. (2010). *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **105**, 2, 163-167.
19. Mabilat, C. & Goussard, S. (1993). PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases. In *Diagnostic Molecular Microbiology: principles and applications*. Edited by Persing, D. H., Smith, T. F., Tenover, F. C. & White, T.J. Washington: American Society for Microbiology, 553-559.
20. Mammina, C., Bonura, C., Aleo, A., Fasciana, T., Brunelli, T., Pesavento, G., Degl'Innocenti, R. & Nastasi, A. (2012). Sequence type 101 (ST101) as the predominant carbapenem-non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* clone in an acute general hospital in Italy. Letters to the Editor. *Int J Antimicrob Agents* **39**, 6, 543-545.
21. Moland, E. S., Black, J. A., Ourada, J., Reisbig, M. D., Hanson, N. D. & Thomson, K. S. (2002). Occurrence of newer β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 U.S. hospitals. *Antimicrob Agents and Chemother* **46**, 12, 3837–

3842.

22. Monteiro, J., Santos, A. F., Asensi, M. D., Peirano, G. & Gales, A. C. (2009). First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents and Chemother* **53**, 1, 333-334.
23. Nelson, E. C., Segal, H. & Elisha, B. G. (2003). Outer membrane protein alterations and *bla*_{TEM-1} variants: their role in β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* **52**, 6, 899-903.
24. Peirano, G., Seki, L. M., Val Passos, V. L., Pinto, M. C., Guerra, L. R. & Asensi, M. D. (2009). Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother* **63**, 2, 265–268.
25. Rajeshwari, H., Nagveni, S., Oli, A., Parashar, D. & Chandrakanth, K. R. (2009). Morphological changes of *Klebsiella pneumoniae* in response to cefotaxime: a scanning electron microscope study. *World Journal Microbiol Biotechnol* **25**, 2263–2266.
26. Rasheed, J. K., Jay, C., Metchock, B., Berkowitz, F., Weigel, L., Crellin, J., Steward, C., Hill, B., Medeiros, A. A. & Tenover, F. C. (1997). Evolution of extended-spectrum β -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents and Chemother* **41**, 3, 647–653.
27. Robin, F., Delmas, J., Chanal, C., Sirot, D., Sirot, J. & Bonnet, R. (2005). TEM-109 (CMT-5), a natural complex mutant of TEM-1 β -lactamase combining the amino acid substitutions of TEM-6 and TEM-33 (IRT-5). *Antimicrob Agents and Chemother* **49**, 11, 4443-4447.
28. Saladin, M., Cao, V. T. B., Lambert, T., Donay, J. L., Herman, J. L., Ould-Hocine, Z., Verdet, C., Delisle, F., Philippon, A. & Arlet, G. (2002). Diversity of CTX-

M β -lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett* **209**, 2, 161-168.

29. Sirot, D., Recule, C., Chaibi, E. B., Bret, L., Croize, J., Chanal-Claris, C., Labia, R. & Sirot, J. (1997). A complex mutant of TEM-1 β -lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents and Chemother* **41**, 6, 1322-1325.

30. Smith Moland, E., Hanson, N. D., Herrera, V. L., Black J. A., Lockhart, T. J., Hossain, A., Johnson, J. A., Gering, R. V. & Thomson, K. S. (2003). Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother* **51**, 3, 711–714.

31. Stefanova, M. E., Tomberg, J., Olesky, M., Holtje, J. V., Gutheil, W. G. & Nicholas, R. A. (2003). *Neisseria gonorrhoeae* penicillin-binding protein 3 exhibits exceptionally high carboxypeptidase and β -lactam binding activities. *Biochemistry* **42**, 49, 14614- 14625.

32. Tristram, S. G., Pitout, M. J., Forward, K., Campbell, S., Nichols, S. & Davidson, R. J. (2008). Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing isolates of *Haemophilus parainfluenzae*. *J Antimicrob Chemother* **61**, 3, 509–514.

33. Veras, D. L., Alves, L. C., Brayner, F. A., Guedes, D. R. D., Maciel, M. A. V., Rocha, C. R. C. & Souza Lopes, A. C. (2011). Prevalence of the *bla*_{SHV} gene in *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from hospital and community infections and from the microbiota of healthy individuals in Recife, Brazil. *Curr Microbiol* **62**, 1610-1616.

34. Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K. & Tenover, F. C. (2001). Novel carbapenem-

hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents and Chemother* **45**, 4, 1151–1161.

Tabela 1. CIM de isolados de *Klebsiella pneumoniae* obtidos em hospitais e sub-CIM usado para análise por microscopia eletrônica.

Isolados ESBL pos.	Cefotaxima (µg ml ⁻¹)			Ceftazidima (µg ml ⁻¹)			Aztreonam (µg ml ⁻¹)			Genes de resistencia
	CIM ^a	sub-CIM ^b		CIM ^a	sub-CIM ^b		CIM ^a	sub-CIM ^b		
		MET ^c	MEV ^d		MET ^c	MEV ^d		MET ^c	MEV ^d	
K3C	>256	64; 32	32	128	32; 16	32	64	32; 16	32	<i>bla</i> _{SHV-11} <i>bla</i> _{TEM-15}
K16R	>256	64; 32	32	32	16; 8	16	16	4	4	<i>bla</i> _{SHV-1} <i>bla</i> _{TEM-1} <i>bla</i> _{CTX-M2}
Isolado KPC pos.	Cefotaxima (µg ml ⁻¹)			Ceftazidima (µg ml ⁻¹)			Imipenem (µg ml ⁻¹)			Genes de resistencia
	CIM ^a	sub-CIM ^b		CIM ^a	sub-CIM ^b		CIM ^a	sub-CIM ^b		
		MET ^c	MEV ^d		MET ^c	MEV ^d		MET ^c	MEV ^d	
K652	≥256	98	98	≥256	27	27	≥128	16	16	<i>bla</i> _{SHV} <i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{KPC-2}

^a CIM: Concentração Inibitória Mínima; ^b sub-CIM: sub-Concentração Inibitória Mínima; ^c MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão; ^d MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura.

Tabela 2. CIM dos isolados de *K. pneumoniae* obtidos de microbiota e sub-CIM usado para microscopia eletrônica.

Isolados	Ampicilina (µg ml ⁻¹)			Amoxicilina (µg ml ⁻¹)			Genes de resistencia
	CIM ^a	sub-CIM ^b		CIM ^a	sub-CIM ^b		
		MET ^c	MEV ^d		MET ^c	MEV ^d	
K58.1-F	16	0.5; 2; 8	0.5; 8	32	0.5; 4;16	0.5; 16	NI
K21.1-F	128	0.5; 16; 32; 64	16; 32; 64	>128	0.5; 4; 16; 64; 128	0.5; 16; 128	<i>bla</i> _{TEM}

^a CIM: Concentração Inibitória Mínima; ^b sub-CIM: sub-Concentração Inibitória Mínima; ^c MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão; ^d MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura. NI: Não identificado os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}.

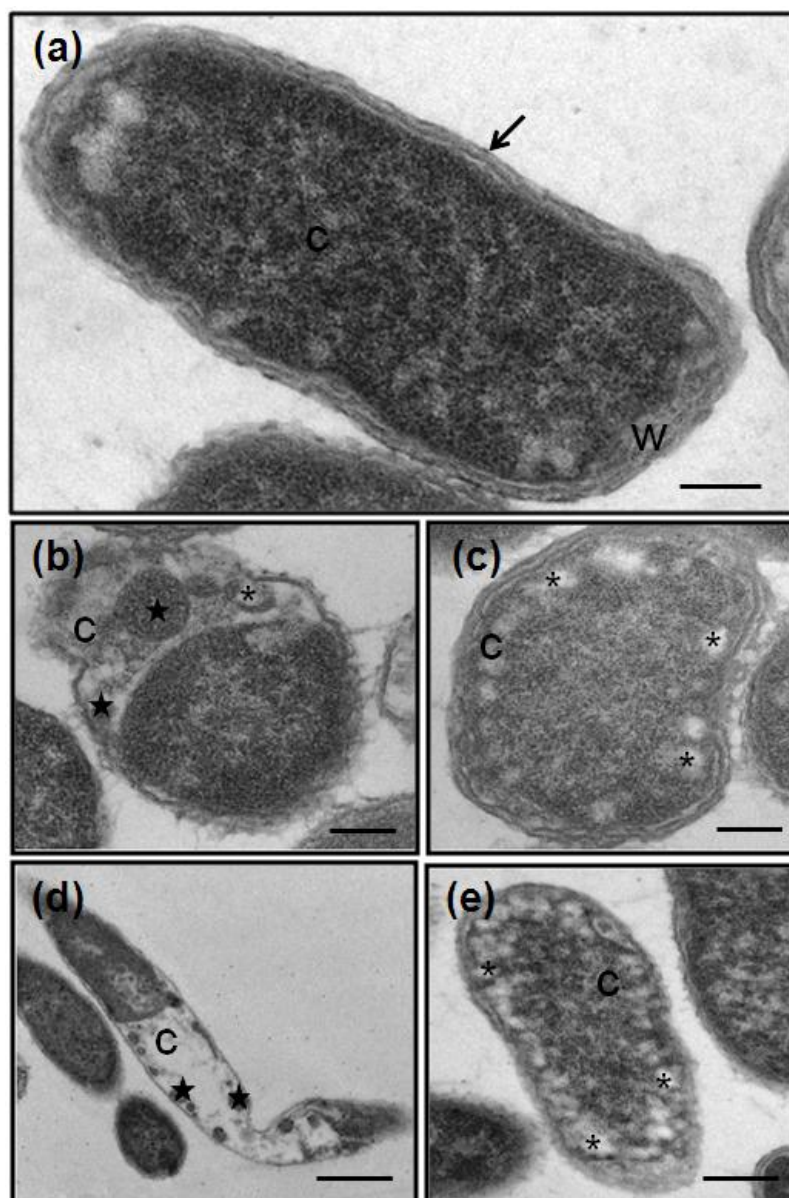


Figura 1 (a-e): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de transmissão do isolado K3C de *K. pneumoniae*. **(a):** células bacterianas sem tratamento (controle) – morfologia preservada, membrana citoplasmática (seta), parede celular (W) e citoplasma intacto (C). **(b-c):** células submetidas a CTX ($64 \mu\text{g ml}^{-1}$) – diminuição do material citoplasmático (C), presença de compartimentos membranares (estrelas), espaços eletróluscentes (asterístico) e desorganização da membrana e parede celular. **(d):** células submetidas a CAZ ($32 \mu\text{g ml}^{-1}$) – morfologia alongada com perda ou retração de material citoplasmático (C) e presença de pequenos compartimentos membranares (estrelas). **(e):** células submetidas a ATM ($32 \mu\text{g ml}^{-1}$) – morfologia normal e presença de espaços eletróluscentes (asterísticos) no citoplasma (C). Barras = $0.5 \mu\text{m}$. CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; ATM: aztreonam.

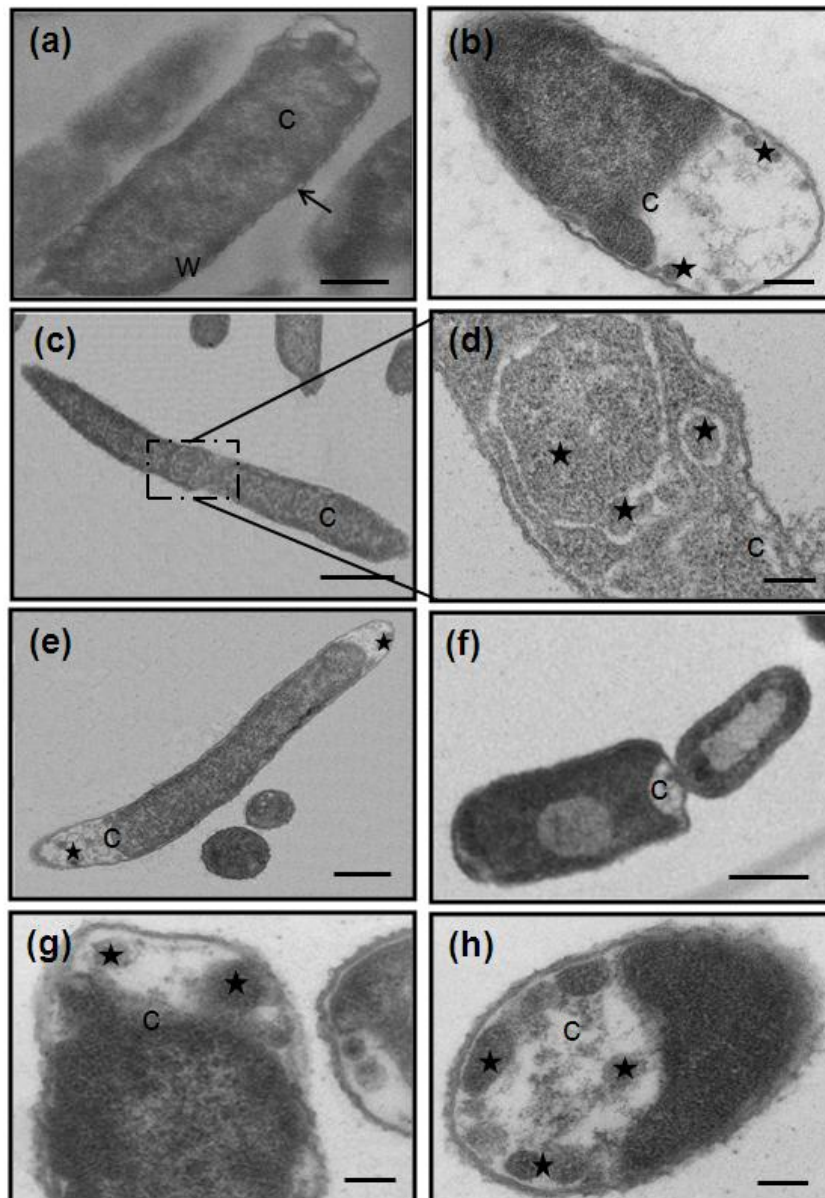


Figura 2 (a-h): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de transmissão do isolado K16R de *K. pneumoniae*. **(a):** células bacterianas sem tratamento – morfologia preservada, membrana citoplasmática (seta), parede celular (w) e citoplasma intacto. **(b):** células submetidas a CTX ($64 \mu\text{g ml}^{-1}$) – presença de grandes espaços eletróluscentes devido o aumento de espaço periplasmático (estrela) e material citoplasmático reduzido (c). **(c-e):** células submetidas a CAZ ($16 \mu\text{g ml}^{-1}$) - **(c-d):** células filamentosas e presença de compartimentos membranaes contendo material citoplasmático (estrela). **(e):** células alongadas apresentando perda de material citoplasmático (estrela). **(f-h):** células submetidas a ATM ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$) – perda de material citoplasmático (c) e presença de compartimentos membranaes (estrelas). Barras = $0.5 \mu\text{m}$. CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; ATM: aztreonam.

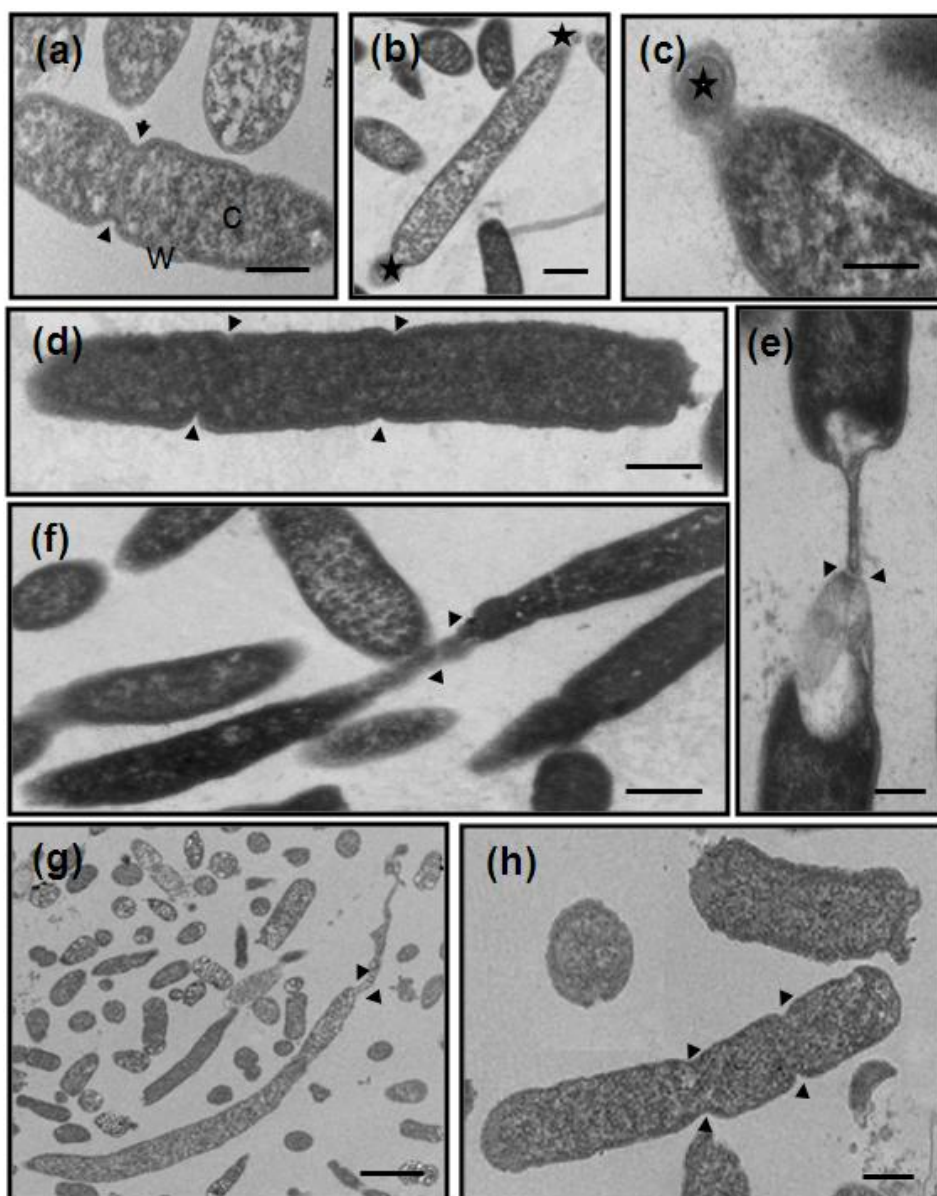


Figura 3 (a-h): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de transmissão do isolado K652 de *K. pneumoniae*. **(a):** células bacterianas não tratadas – parede celular com morfologia preservada (w) e citoplasma intacto (c), formação regular de septos (cabeça de seta). **(b-c):** células submetidas a CTX ($98 \mu\text{g ml}^{-1}$) – presença de células não crescidas e arredondadas (estrela) na extremidade das células com morfologia normal. **(d-f):** células submetidas a CAZ ($27 \mu\text{g ml}^{-1}$) – formação de septos consecutivos (pontas de seta), promovendo alongamento da morfologia bacteriana. Observar desorganização da membrana e parede celular com aspecto elástico. **(g-h):** células submetidas a IMP ($16 \mu\text{g ml}^{-1}$) – morfologia de aparência alongada com formação de septos consecutivos (pontas de seta). Barras = $0.5 \mu\text{m}$. CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; IMP: imipenem.

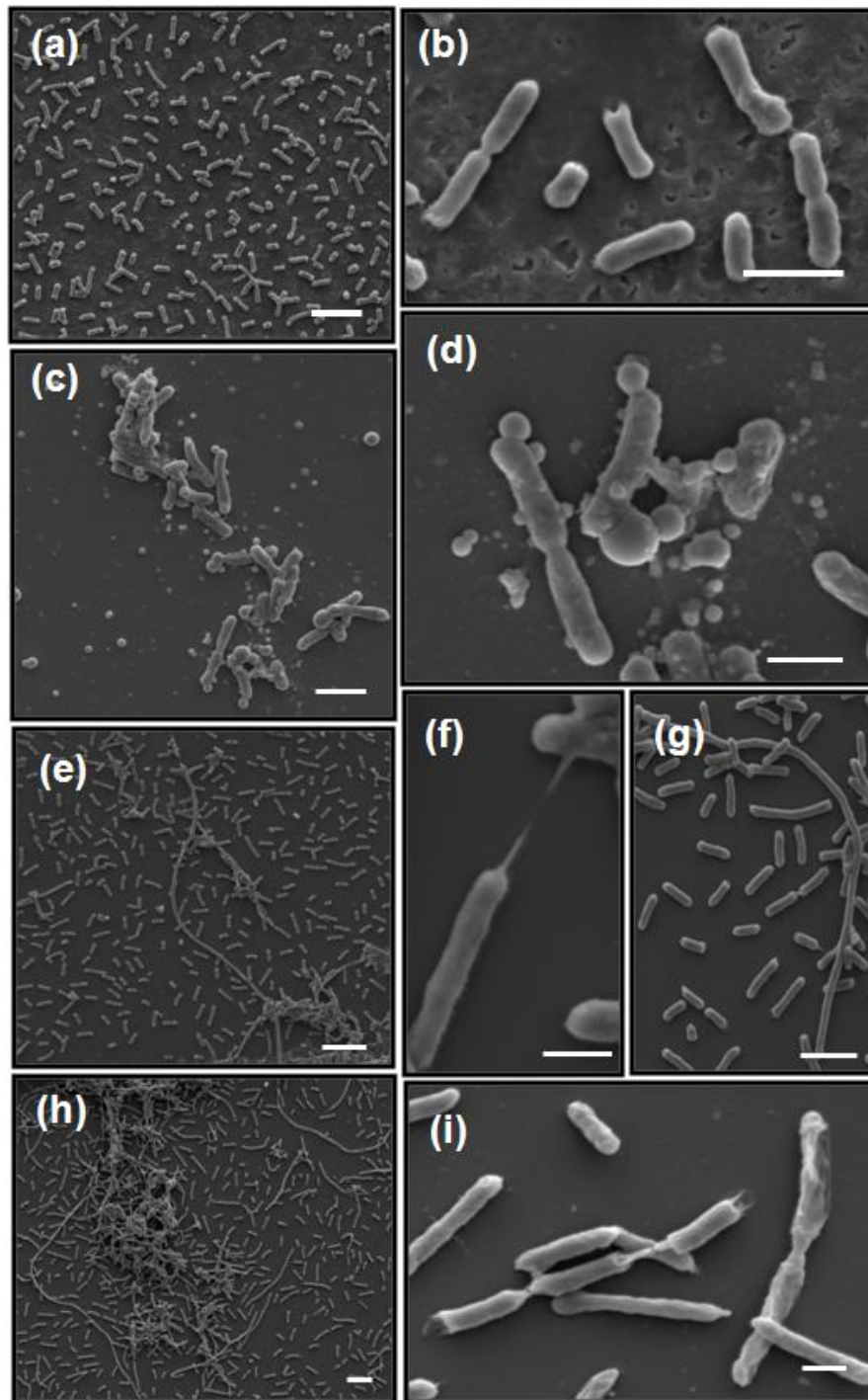


Figura 4 (a-i): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura do isolado K652. **(a-b):** células controle com morfologia preservada. **(c-d):** células submetidas a CTX ($98 \mu\text{g ml}^{-1}$). Observar células esféricas não crescidas sendo formadas de células com morfologia preservada. **(e-g):** células submetidas a CAZ ($27 \mu\text{g ml}^{-1}$). Observar células alongadas formando filamentos. **(h-i):** células submetidas a IMP ($16 \mu\text{g ml}^{-1}$). Observar células alongadas devido a sucessivas divisões não finalizadas. Barras = $2\mu\text{m}$. CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; IMP: imipenem.

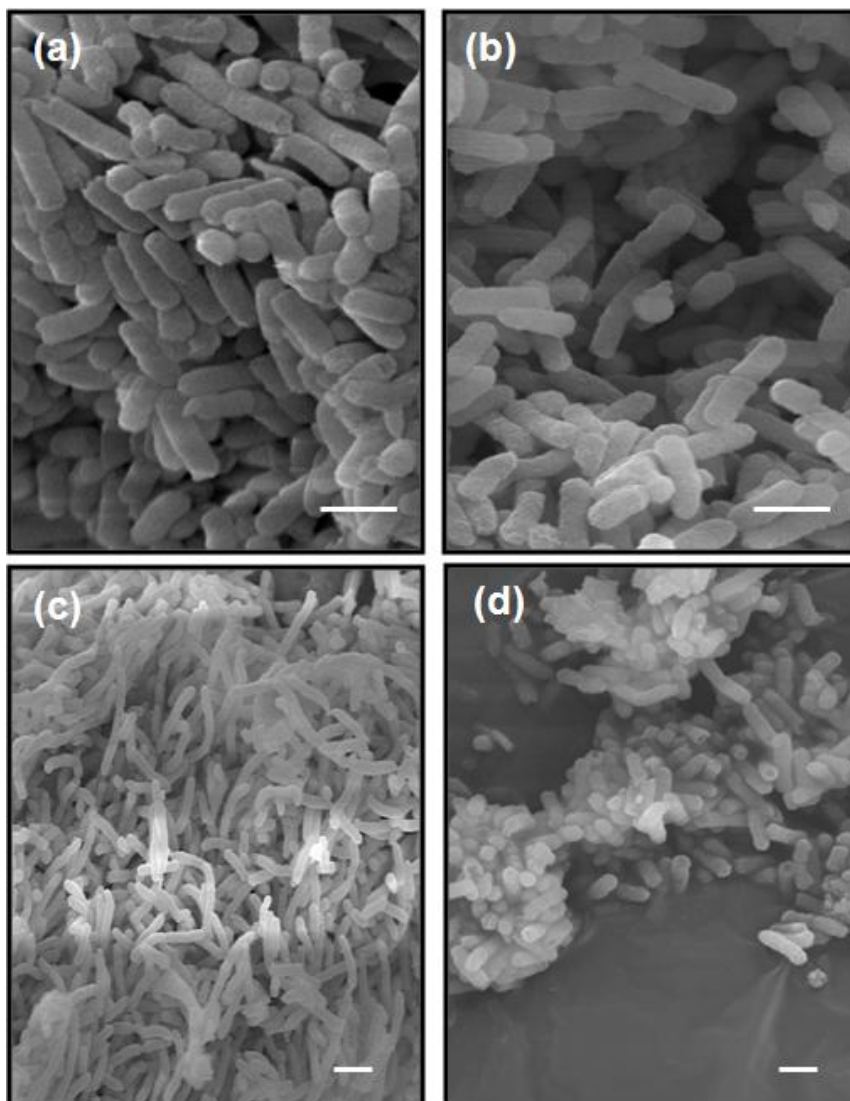


Figura 5 (a-d): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura do isolado K16R. **(a):** células controle com morfologia preservada. **(b):** células submetidas a CTX ($32 \mu\text{g ml}^{-1}$). **(c):** células submetidas a CAZ ($16 \mu\text{g ml}^{-1}$). **(d):** células submetidas a ATM ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$). Barras = $2\mu\text{m}$. CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; ATM: aztreonam.

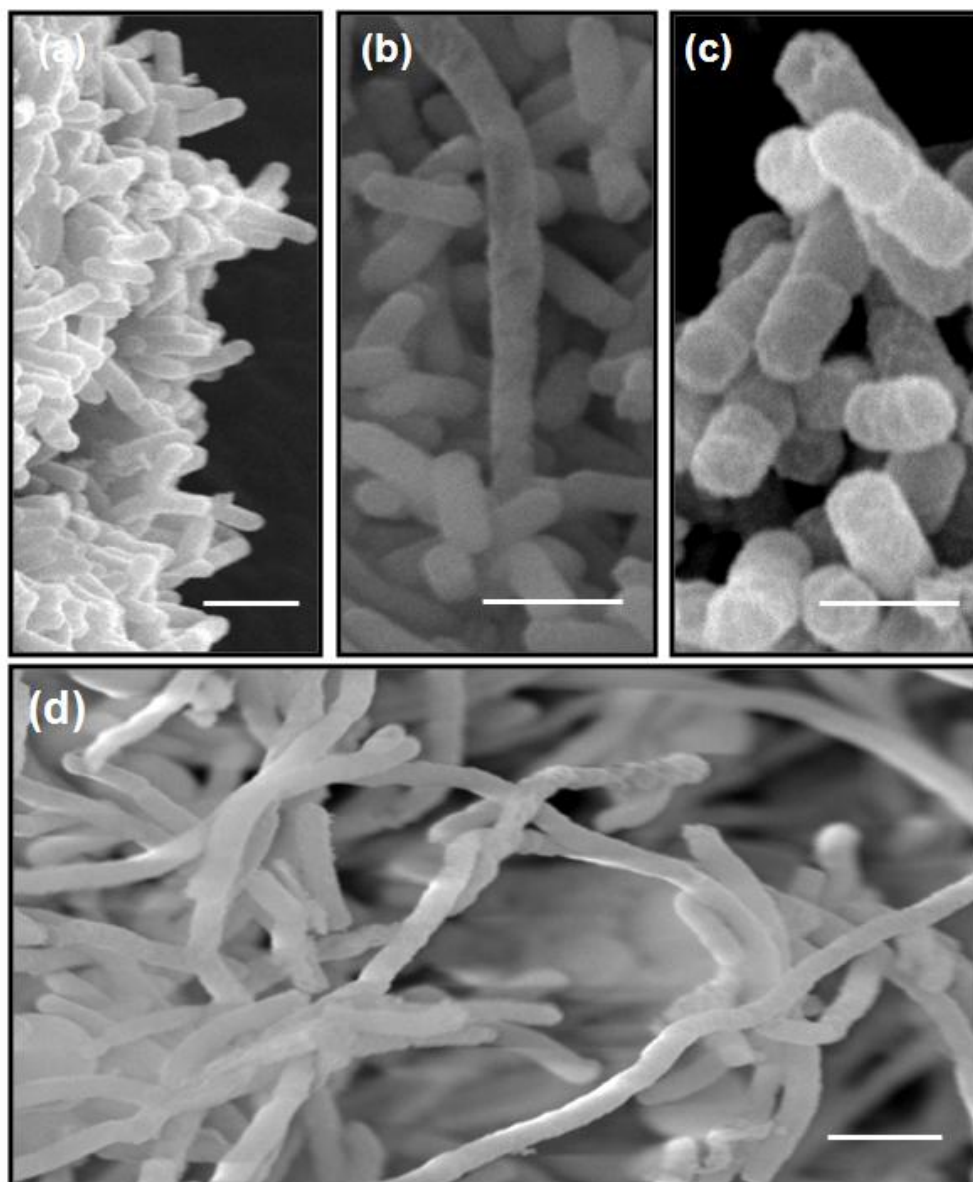


Figura 6 (a-d): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de varredura do isolado K3C. **(a):** células controle com morfologia preservada. **(b):** células submetidas a CTX ($32 \mu\text{g ml}^{-1}$). **(c):** células submetidas a CAZ ($32 \mu\text{g ml}^{-1}$). **(d):** células submetidas a ATM ($32 \mu\text{g ml}^{-1}$). Bars = $2\mu\text{m}$. CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; ATM: aztreonam.

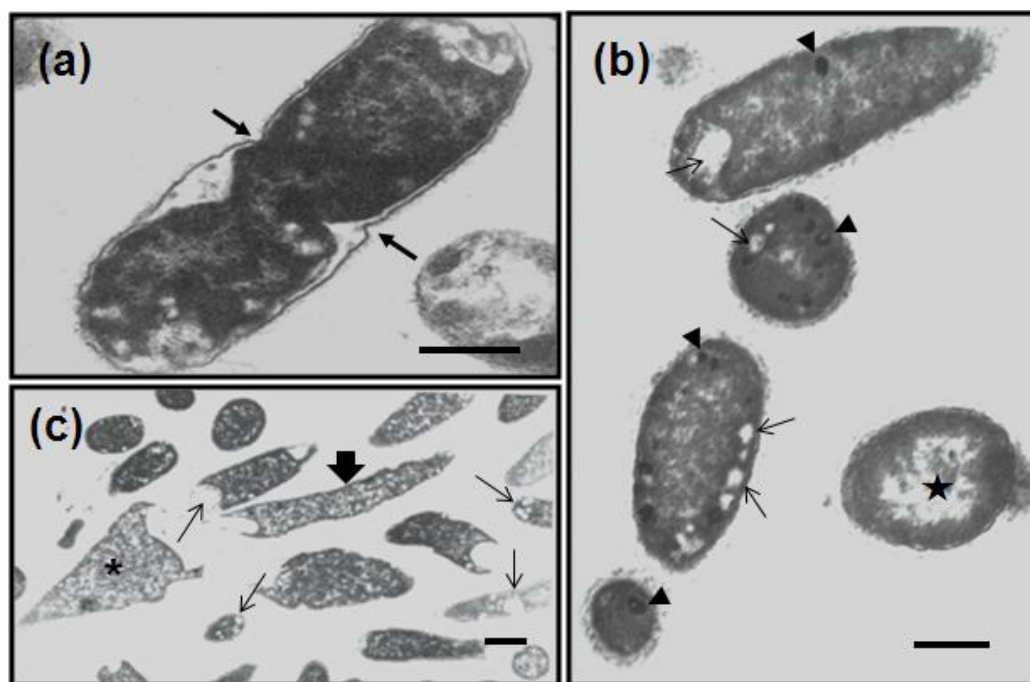


Figura 7 (a-c): Eletromicrografias de microscopia eletrônica de transmissão dos isolados K21.1-F e K58.1-F de *K. pneumoniae*. **(a):** isolado K21.1-F submetido a $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de ampicilina. Observar formação irregular de septos na divisão celular (seta). **(b):** isolado K58.1-F submetido a $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de ampicilina. Presença de espaços eletróluscentes (seta fina), e eletrondensos (cabeça de seta) com diferentes tamanhos e formas pelo citoplasma bacteriano, em adição a perda de conteúdo citoplasmático (estrela). **(c):** isolado K58.1-F submetido a $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ de amoxicilina. As células exibem morfologia alterada com alongamento celular (setas largas) e formas indefinidas (asterístico), com a presença de espaço eletróluscente com formas e tamanhos variados no citoplasma bacteriano (setas finas). Barras = $0.5 \mu\text{m}$.

7.2 ARTIGO 2 - submetido à Revista Microbial Drug Resistance (Apêndice B)

Inibição da produção de cápsula polissacarídica por cefalosporinas, aztreonam e imipenem em isolados de *Klebsiella pneumoniae* portadores dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} ou *bla*_{KPC}

Dyana Leal Veras

Setor de Microscopia Eletrônica/Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-
Universidade Federal de Pernambuco – LIKA/UFPE – Brasi.

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

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

Departamento de Enfermagem - Faculdade de Ciências Humanas de Olinda –
FACHO.

*Endereço para correspondência:

Dyana Leal Veras

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/Fiocruz

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

CEP: 50.670-420 Caixa Postal: 7472

Telefone: +55 81 2101-2643/2101-2542. E-mail: dleal@cpqam.ficoruz.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar a influência de antibióticos β -lactâmicos na produção de CPS em cinco isolados de *K. pneumoniae*, portadores dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} ou *bla*_{KPC}. Dois isolados clínicos e dois da comunidade com perfil de resistência às cefalosporinas de terceira geração e ao aztreonam com diferentes genes de resistência para ESBLs, foram submetidos a concentrações clinicamente relevantes de cefotaxima, ceftazidima e aztreonam. Outro isolado clínico com perfil de resistência às cefalosporinas de terceira geração e aos carbapenêmicos, portador do gene *bla*_{KPC-2}, foi submetido a concentrações clinicamente relevantes de cefotaxima, ceftazidima e imipenem. A influência dos antibióticos sobre a produção de CPS nos isolados de *K. pneumoniae* foi avaliada através da MET. Todos os isolados clínicos tiveram confirmação da presença da região promotora do operon envolvido na produção de CPS. A ceftazidima e o aztreonam foram capazes de inibir a produção de CPS nos isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBLs mas não no isolado produtor de KPC, o qual teve sua síntese fortemente inibida apenas pelo imipenem. A cefotaxima não interferiu na produção de CPS em nenhum dos isolados analisados. Neste estudo a ceftazidima, o aztreonam e o imipenem, utilizados em concentrações clinicamente relevantes, foram capazes de diminuir a produção de CPS em isolados clínicos e de comunidade de *K. pneumoniae*, o que pode contribuir para diminuir a expressão do fator de virulência mais importante desta espécie bacteriana.

Palavras chaves: *Klebsiella pneumoniae*, cápsula polissacarídica, β -lactâmicos, ESBL, KPC.

Introdução

Infecções graves causadas por isolados de *Klebsiella pneumoniae* se tornaram um problema significativo em todo o mundo, sendo associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade.^{6, 16}

As penicilinas, cefalosporinas e os carbapenêmicos estão inclusos nos regimes de tratamento de escolha para muitas doenças infecciosas, incluindo por *K. pneumoniae*, sendo a produção de β -lactamases o mecanismo mais comum de resistência a esta classe de antibacterianos em bactérias gram-negativas clinicamente importantes.⁴

A resistência fenotípica a antibióticos β -lactâmicos em isolados de *K. pneumoniae* MDR está envolvida com a produção de Extended Spectrum β -Lactamases (ESBL) principalmente do grupo 2, TEM, SHV e CTX, e mais recentemente a produção de KPC.^{13, 20, 21}

A primeira linha de defesa da maioria dos patógenos bacterianos consiste na elaboração da cápsula polissacarídica (CPS), o que proporciona evasão do sistema imunológico do hospedeiro contribuindo para a patogênese bacteriana. Devido sua importância, seria interessante o desenvolvimento de novas substâncias capazes de interferir com a expressão da CPS.^{8,18}

No entanto, apesar da grande influência da CPS na patogênese bacteriana não existem trabalhos que avaliem o impacto de antibióticos importantes clinicamente, como os β -lactâmicos, na capacidade de produção de CPS em isolados de *K. pneumoniae* MDR portadores de diferentes genes de resistência.

O aumento da prevalência de bactérias resistentes aos antibióticos prenuncia uma era pós-antibiótico iminente, caracterizada pela diminuição da eficácia dos antibióticos comuns e aplicação rotineira de abordagens terapêuticas multifacetadas,

complementares para o tratamento de infecções bacterianas.⁸ Portanto, novas estratégias precisam ser propostas, onde os antibióticos antigos e descartados ou mesmo rejeitados, devem ser novamente investigados, reaproveitados e utilizados quando necessário.⁵

Portanto, este trabalho teve o objetivo de identificar através da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), a interferência de antibióticos β -lactâmicos na produção de CPS em isolados de *K. pneumoniae* obtidos de diferentes origens e portadores dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} ou *bla*_{KPC}.

Materiais e Métodos

Isolados bacterianos

Este estudo foi realizado utilizando cinco isolados de *K. pneumoniae* obtidos em Recife-PE, Brasil (tabela 1). Os isolados K3C e K16R foram obtidos de infecções relacionadas a assistência a saúde do trato urinário a partir de pacientes internados em unidades hospitalares distintas. Estes isolados possuem resistência a cefotaxima, ceftazidima e ao aztreonam, segundo critérios interpretativos do CLSI, 2013.⁷ O isolado K16R possui os genes *bla*_{SHV-1}, *bla*_{TEM-1} e *bla*_{CTX-M2} e o isolado K3C possui os genes *bla*_{SHV-11} e *bla*_{TEM-15}, identificados anteriormente.^{14, 19}

O isolado K652 foi obtido por pesquisa de vigilância a partir de swab retal de indivíduo sem sintomas clínicos de infecção bacteriana, internado em outro hospital da rede pública. Este isolado possui o gene *bla*_{KPC-2} e apresenta resistência a cefotaxima, ceftazidima, aztreonam e imipenem, identificado em sistema automatizado VITEK-2 (Biomeriux) e confirmado pelo teste de macrodiluição em

caldo, segundo recomendações do CLSI, 2013.⁷

Os isolados K3CM e K11CM foram obtidos de infecções do trato urinário de diferentes pacientes oriundos da comunidade. Estes isolados apresentam resistência a cefotaxima, ceftazidima e aztreonam pelo teste de macrodiluição em caldo, segundo recomendações do CLSI, 2013.⁷ O isolado K3CM possui os genes *bla*_{SHV-1} e *bla*_{CTX-M2} e o K11CM o gene *bla*_{CTX-M2}.^{14, 19}

Amplificação e sequenciamento de região promotora do operon relacionado à produção de CPS

O DNA genômico dos isolados de *K. pneumoniae* foi extraído utilizando o *Kit Wizard Genomic DNA purification* (Promega), segundo instruções do fabricante. A determinação da presença da região promotora gênica, para qualquer sorotipo capsular, foi realizada por PCR nos isolados de *K. pneumoniae*, utilizando os primers *cpsp*: 5'-TCCCAATTGTGACCGAAATC-3' e o *cpsprev*: 5'-GCTCGCGGCACCAGCTGA-3'.¹¹ Após purificação dos amplicons, utilizando o PureLink PCR Micro Kit (Invitrogen), o DNA foi sequenciado através do método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo.¹⁷ A análise das seqüências de DNA e o alinhamento múltiplo foi realizada utilizando os programas DNASTar e BLAST.³

Determinação da produção de CPS por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A produção de CPS fixada à célula bacteriana foi analisada nos isolados de *K. pneumoniae* sem e com submissão às cefalosporinas de terceira geração, ao aztreonam e imipenem (Sigma Aldrich). Os isolados foram crescidos em caldo

Mueller Hinton por 18 horas, contendo concentrações clinicamente relevantes dos diferentes antibióticos β -lactâmicos, de acordo com o perfil fenotípico de resistência apresentado (tabela 1).^{1, 2} Em todos os processamentos foram inclusos um controle de cada isolado nas mesmas condições, sem a presença do antibiótico. Devido a constituição polissacarídica da CPS bacteriana, a identificação da produção da CPS foi realizada utilizando a técnica de citoquímica de carboidratos, através da marcação com vermelho de rutenio a 0,07%,¹⁰ com modificações.

Resumidamente, após o crescimento bacteriano, as células foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH, 7,4 e centrifugadas para posterior fixação em tampão fosfato 0,1M, glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído 4% e 0,07% de vermelho de rutenio (Sigma Aldrich). Após a fixação, as células foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% e 0,07% de vermelho de rutenio (Sigma Aldrich). Posteriormente, as células foram lavadas em tampão fosfato 0,1M e desidratadas, utilizando uma série crescente de acetona de 30 a 100% (Sigma Aldrich). Após a desidratação foi realizada a infiltração do material e emblocamento em resina Epon 812 (Electron Microscopy Science), para posterior obtenção de cortes ultrafinos e observação em Microscópio Eletrônico de Transmissão ZEISS EM109.

Apenas os antibióticos que induziram ao mesmo tempo, diferença no número de células marcadas e na densidade de partículas eletrondensas agregadas à superfície celular foram considerados como inibidores da produção de CPS nos isolados analisados.

Resultados

Produção de CPS

Todos os isolados analisados possuem a região promotora do operon relacionado a produção de CPS. As sequencias dos isolados K3C, K16R, K652, K3CM e K11CM foram depositadas no Genbank database sob os números de acesso KJ411822, KJ411823, KJ411824, KJ411825, KJ411826, respectivamente. A análise dos isolados controle pela MET, confirmou a produção de CPS em todos os isolados analisados, demonstrando um padrão de marcação em que a maioria das células bacterianas demonstraram agregação com alta densidade de partículas eletrondensas em toda a extensão da superfície celular (figuras 1A, 2A, 3A, 4A e 5A).

Efeitos dos antibióticos na produção de CPS

Isolados de comunidade de *K. pneumoniae*

Os isolados de *K. pneumoniae* K3CM e K11CM são resistentes a cefotaxima, ceftazidima e aztreonam e possuem o gene de resistência *bla*_{CTX-M2}. A submissão dos isolados a cefotaxima e ceftazidima não induziu diferenciação no padrão de agregação do vermelho de rutenio à superfície celular bacteriana em nenhum dos isolados. No entanto, o aztreonam induziu diminuição da densidade de marcação da CPS quando comparada às células controle de ambos isolados, podendo ser determinada pela análise de campos de mesma magnitude, onde foi observado menor número de células com a superfície celular agregada às partículas eletrondensas. Apesar da ceftazidima não causar efeitos na produção de CPS, induziu modificação morfológica com filamentação celular, devido a divisões

celulares não finalizadas em várias células dos isolados analisados (figuras 4 e 5).

Isolados clínicos de *K. pneumoniae*

Os isolados K3C e K16R apresentaram modificações no padrão de agregação das partículas eletrondensas do vermelho de rutenio, indicando diminuição da produção de CPS devido a submissão à ceftazidima e aztreonam, apesar de possuírem os genes *bla*_{TEM-15} e *bla*_{CTX-M2}, respectivamente (figuras 1 e 2). Os isolados apresentaram ainda filamentação celular devido a exposição a ceftazidima com alongamento dos septos de divisão, proporcionando muitas vezes aspecto elástico à região de divisão das células bacterianas. Algumas células submetidas ao aztreonam sofreram lise devido a inibição da formação de parede celular durante a divisão bacteriana.

O isolado K652 apresenta alta resistência a ceftazidima, cefotaxima e imipenem e possui o gene *bla*_{KPC-2}. A submissão deste isolado a ceftazidima, diferentemente dos outros isolados clínicos, não provocou diminuição de quantidade de células marcadas pelo vermelho de rutenio ou na densidade de partículas eletrondensas aderidas em relação ao controle. No entanto, as células também apresentaram filamentação celular (figura 3).

A submissão do isolado K652 ao imipenem, surpreendentemente, inibiu quase completamente a produção de CPS fixada às células bacterianas, podendo ser visualizadas apenas raras células com pequenas e poucas marcações eletrondensas próximas a superfície celular bacteriana. Adicionalmente, as células apresentaram filamentação celular com deformação dos septos de divisão devido a submissão ao imipenem.

Semelhantemente aos isolados da comunidade, a submissão dos isolados

clínicos de *K. pneumoniae* à cefotaxima não provocou diminuição da produção de CPS nos isolados analisados (figuras 1, 2 e 3).

Discussão

A CPS bacteriana possui uma grande importância na evasão do sistema imunológico do hospedeiro, sendo implicado recentemente como um importante alvo para o desenvolvimento de futuros compostos terapêuticos de amplo espectro, visando substituir ou complementar a terapia com antimicrobianos. A remoção da CPS expõe as bactérias às vias de depuração imunes mediadas freqüentemente pela ativação do sistema complemento, tornando-os menos virulentos e mais sensíveis ao soro humano.⁸

Alguns trabalhos têm relatado modificações na produção de CPS em isolados de *K. pneumoniae* e *Escherichia coli* devido a submissão a antibióticos β -lactâmicos, quinolônicos e aminoglicosídeos.^{9, 10, 15} Em *K. pneumoniae* o aumento da produção de CPS fixada à célula bacteriana foi encontrado após submissão ao ciprofloxacino mas não à ceftazidima.¹⁰ Este aumento foi baseado em medidas do diâmetro da CPS identificada por MET mas não na densidade de marcação pelo vermelho de rutenio. Em outros estudos, no entanto, foi sugerido que a produção de CPS diminuiu devido à submissão de isolados de *Klebsiella oxytoca* e *E. coli* ao ciprofloxacino.¹²

Neste trabalho, todos os isolados de *K. pneumoniae* apresentaram a região promotora do operon relacionado a produção de CPS e foram capazes de produzi-la *in vitro* sem submissão a antibióticos β -lactâmicos. No entanto, a ceftazidima e o aztreonam foram capazes de diminuir a quantidade de CPS fixada à superfície

celular nos isolados de *K. pneumoniae* portadores dos genes *bla*_{TEM-15} ou *bla*_{CTX-M2} e resistentes a estes antibióticos. A análise do efeito do imipenem sobre o isolado de *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos, demonstrou uma forte inibição da síntese de CPS fixada às células, o que foi surpreendente devido a alta resistência apresentada pelo isolado bacteriano e por ser portador do gene *bla*_{KPC-2}. Esta inibição pode estar relacionada a interferência do imipenem no metabolismo bacteriano, devido o ambiente hostil provocado pela presença do antibiótico. Este é o primeiro trabalho que relata a interferência do imipenem na produção de CPS em isolado de *K. pneumoniae* portador do gene *bla*_{KPC-2} com resistência a carbapenêmicos.

A produção de CPS também foi anteriormente investigada em outros estudos utilizando um isolado de *E. coli* submetido a canamicina e estreptomicina, onde o pré-tratamento com os aminoglicosídeos provocou um padrão adaptativo com o aumento da produção de CPS, sendo relacionado a uma resposta benéfica para a célula bacteriana por diminuir a permeabilidade celular ao antibiótico.^{9, 15} Estes estudos alertam sobre a importância da administração de antibiótico adequado durante o curso do tratamento de infecções bacterianas, devido doses sub-letais de antibióticos aumentarem a capacidade de isolados sensíveis de *E. coli* defenderem-se da ação dos aminoglicosídeos.

Neste estudo a ceftazidima, o aztreonam e o imipenem, utilizados em concentrações clinicamente relevantes frente isolados resistentes de *K. pneumoniae*, foram capazes de inibir a produção de CPS em ambos isolados clínicos e de comunidade, o que pode contribuir para diminuir a expressão do fator de virulência mais importante desta espécie bacteriana.

Agradecimentos

Nós agradecemos ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde – PDTIS da Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ e ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ, especialmente a. Cássia Docena for technical assistance.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pelo Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde - PAPES IV (Processo número 407826/2012-2) - Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ e pelo Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/FIOCRUZ (Verba do tesouro).

Conflitos de Interesses

Não existem conflitos de interesse financeiro concorrente.

Aprovação por Comitê de Ética

Não requisitado.

Tabela 1. CIM dos isolados de *K. pneumoniae* obtidos em ambiente hospitalar e de infecção na comunidade frente a cefotaxima, ceftazidima, aztreonam e imipenem e sub-CIMs utilizados para análise pela MET.

Isolado ESBL pos.	Cefotaxima (mg/L)		Ceftazidima (mg/L)		Aztreonam (mg/L)	
	CIM	Sub-CIM	CIM	sub-CIM	CIM	sub-CIM
K3C	>256*	32	128*	32	64*	32
K16R	>256*	32	32*	16	16*	4
K3CM	>256*	32	64*	32	64*	32
K11CM	>256*	32	64*	32	256*	32
Isolado KPC pos.	Cefotaxime (mg/L)		Ceftazidime (mg/L)		Imipenem (mg/L)	
	CIM	sub-CIM	CIM	sub-CIM ^b	CIM	sub-CIM
K652	≥256**	98	≥256**	27	≥128**	16

Siglas: CIM: Concentração Inibitória Mínima; sub-CIM: Concentração sub-Inibitória; * Dados obtidos em outros estudos (LOPES et al., 2010; VERAS et al., 2011).

** Dados não publicados.

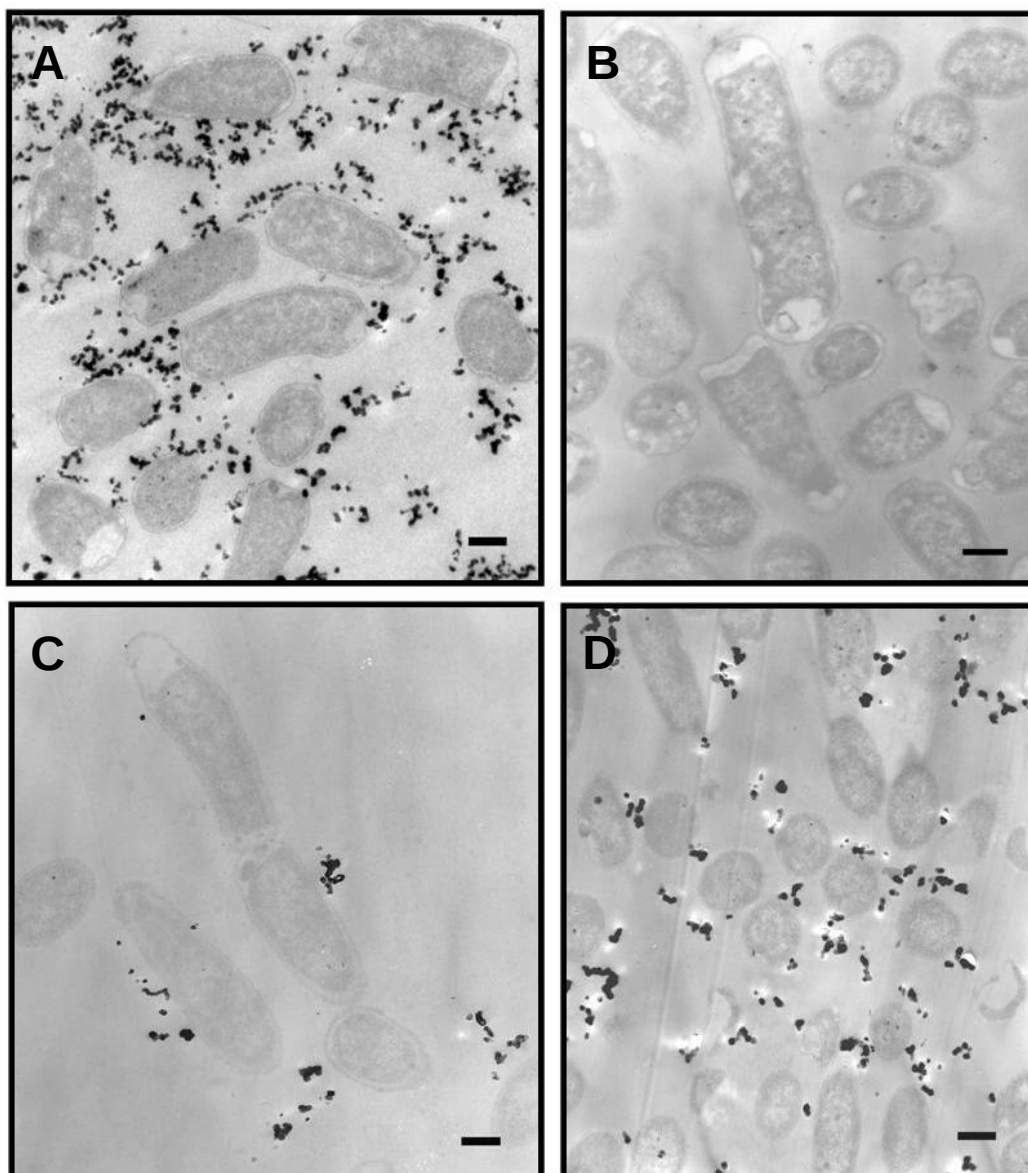


Figura 1 (A-D): Eletromicrografias do isolado K3C de *K. pneumoniae* submetido ao aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX). **(A):** células bacterianas sem tratamento (controle) - morfologia preservada com a maioria das células marcadas pelas partículas eletrondensas do vermelho de rutenio. **(B):** células submetidas ao ATM – observar células sem marcação pelo vermelho de Rutenio. **(C):** células submetidas a CAZ – observar morfologia filamentosa e presença de poucas marcações eletrondensas ao redor das células bacterianas. **(D):** células submetidas a CTX – observar a maioria das células marcadas em densidade similar ao controle (A). Barras: A = 2 μm ; B-D = 1 μm .

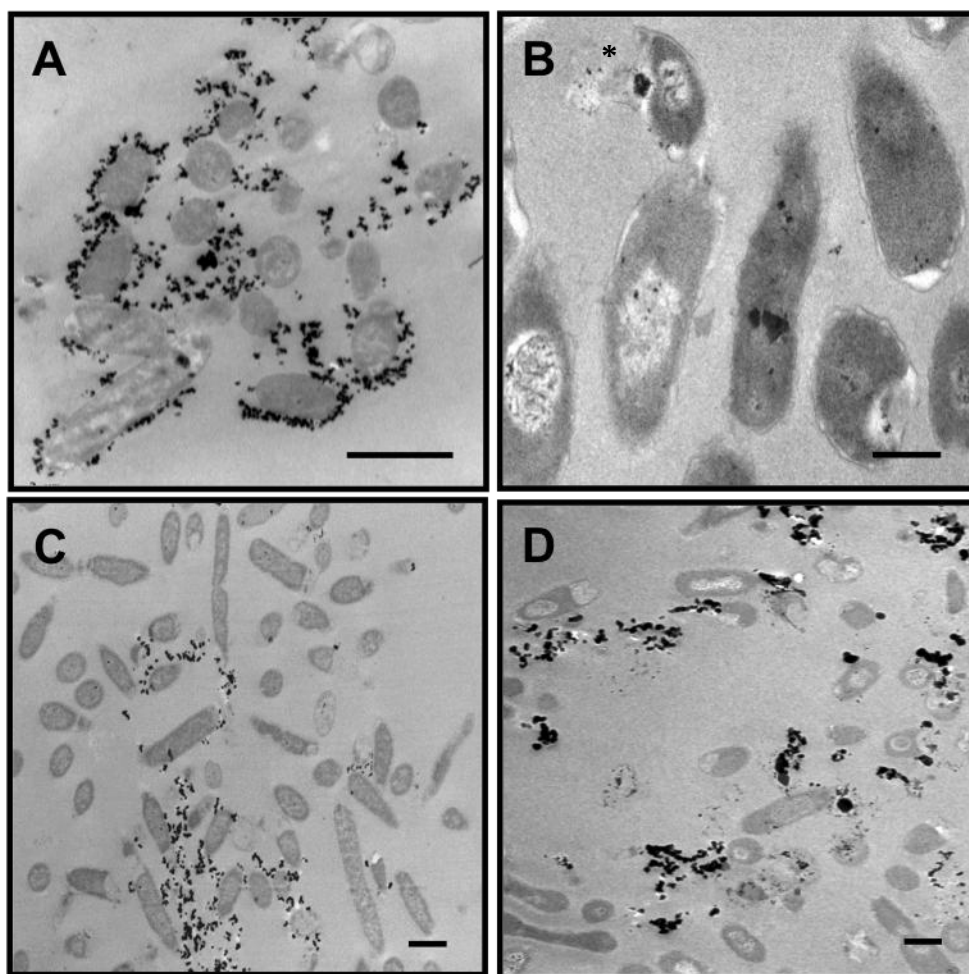


Figura 2 (A-D): Eletromicrografias do isolado K16R de *K. pneumoniae* controle e submetido a aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX). **(A):** células bacterianas sem tratamento (controle) - morfologia preservada com a maioria das células marcadas pelas partículas eletrondensas do vermelho de rutenio. **(B):** células submetidas ao ATM – ausência de marcação de partículas eletrondensas e extravasamento de material citoplasmático devido rompimento de membrana citoplasmática (asterisco) **(C):** células submetidas a CAZ – presença de células filamentosas e marcação de algumas células bacterianas pelo vermelho de rutenio. **(D):** células submetidas a CTX – observar a maioria das células marcadas em densidade similar ao controle (A). Barras: A = 2 μm ; B = 0,5 μm ; C-D = 1 μm .

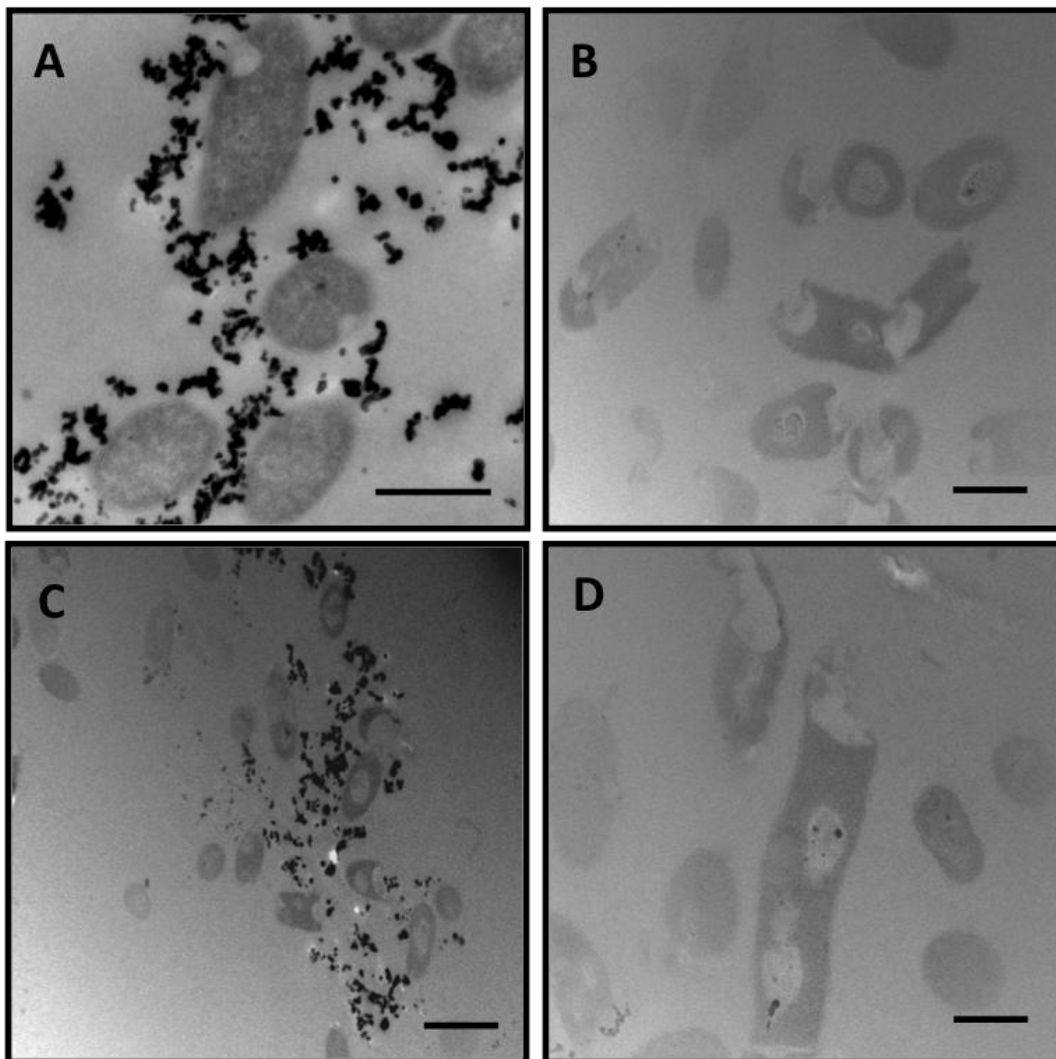


Figura 3 (A-D): Eletromicrografias do isolado K652 de *K. pneumoniae* controle e submetido a ceftazidima (CAZ), imipenem (IMP) e cefotaxima (CTX). **(A):** células bacterianas sem tratamento (controle) - morfologia preservada com a maioria das células marcadas pelas partículas eletrondensas do vermelho de rutenio. **(B):** células submetidas a CAZ – observar células sem marcação pelo vermelho de rutenio. **(C):** células submetidas a CTX – observar a maioria das células marcadas em densidade similar ao controle A. **(D):** células submetidas ao IMP – observar presença de células alongadas sem marcação pelo vermelho de rutenio. Barras: A-D = 1 μ m.

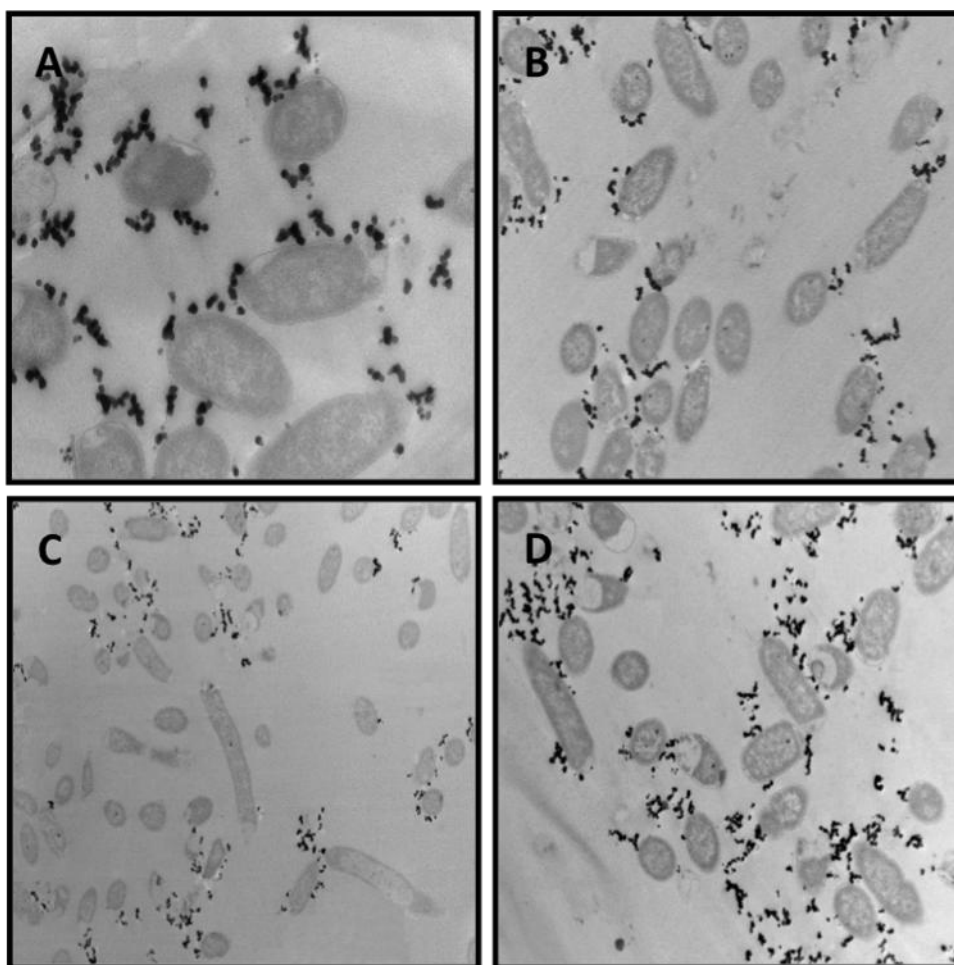


Figura 4 (A-D): Eletromicrografias do isolado K11CM de *K. pneumoniae* controle e submetido ao aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX). **(A):** células bacterianas sem tratamento (controle) - apresenta morfologia preservada com a maioria das células marcadas pelas partículas eletrondensas do vermelho de rutenio **(B):** células submetidas ao ATM – observar células com menos marcação pelo vermelho de rutenio em relação ao controle (A). **(C):** células submetidas a CAZ - células filamentosas marcadas por partículas eletrondensas na superfície celular. **(D):** células submetidas a CTX - Observar a maioria das células marcadas pelo vermelho de rutenio. Barras: A-D = 1 μ m.

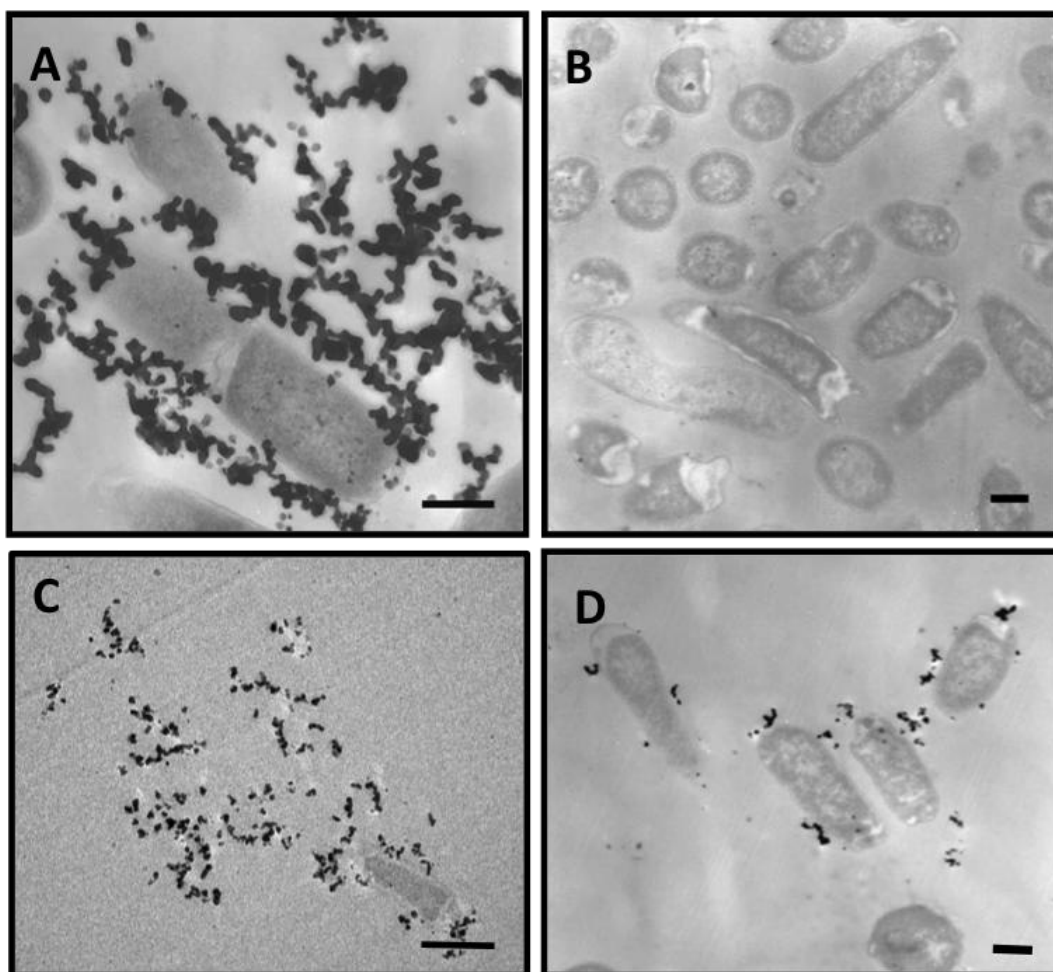


Figura 5 (A-D): Eletromicrografias do isolado K3CM de *K. pneumoniae* controle e submetido ao aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX). **(A):** células bacterianas sem tratamento - apresenta morfologia preservada com a maioria das células marcadas pelas partículas eletrondensas do vermelho de rutenio. **(B):** células submetidas ao ATM – observar células sem marcação pelo vermelho de rutenio. **(C - D):** células submetidas a CAZ e CTX, respetivamente: maioria das células marcadas por partículas eletrondensas na superfície celular em densidade similar ao controle A. Barras: A - D = 1 μ m.

Referencias

1. Adamis, G., M.G. Papaioannou, E.J. Giamarellos-Bourboulis, P. Gargalianos, J. Kosmidis, and H. Giamarellou. 2004. Pharmacokinetic interactions of ceftazidime, imipenem and aztreonam with amikacin in healthy volunteers. *Int J Antimicrob Agents*. 23:2: 144-149.
2. Ahsman, M.J., E.D. Wildschut, D. Tibboel, and R.A. Mathot. 2010. Pharmacokinetics of cefotaxime and desacetylcefotaxime in infants during extracorporeal membrane oxygenation. *Antimicrob Agents Chemother*. 54:5: 1734-1741.
3. Basic Local Alignment Search Tool [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>].
4. Bush, K., and G.A. Jacoby. 2010. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 54:3: 969-76.
5. Bush, K., P. Courvalin, G. Dantas, J. Davies, B. Eisenstein, P. Huovinen, G.A. Jacoby, R. Kishony, B.N. Kreiswirth, E. Kutter, S.A. Lerner, S. Levy, K. Lewis, O. Lomovskaya, J.H. Miller, S. Mobashery, L.J. Piddock, S. Projan, C.M. Thomas, A. Tomasz, P.M. Tulkens, T.R. Walsh, J.D. Watson, J. Witkowski, W. Witte, G. Wright, P. Yeh, and H.I. Zgurskaya. 2011. Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 9:12: 894-896.
6. Ceccarelli, G., M. Falcone, A. Giordano, M. L. Mezzatesta, C. Caio, S. Stefani, and M. Venditti. 2013. Successful ertapenem-doripenem combination treatment of bacteremic ventilator-associated pneumonia due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 57:6: 2900-2901.

7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement M100-S15. CLSI, Wayne, PA, USA, 2013.
8. Cress, B.F., J.A. Englaender, W. He, D. Kasper, R.J. Linhardt, and M.A. Koffas. 2013. Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. FEMS Microbiol Rev. In press.
9. Ganai S., C. Gaudin, K. Roensch, and M. Tran. 2007. Effects of streptomycin and kanamycin on the production of capsular polysaccharides in *Escherichia coli* B23 cells. J Exp Microbiol Immunol. 11: 54-59.
10. Held T.K., C. Adamczik, M. Trautmann, and A.S. Cross. 1995. Effects of MICs and Sub-MICs of antibiotics on production of capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 39: 5: 1093-1096.
11. Hennequin, C., and C. Forestier. 2007. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. Res Microbiol. 158: 339-347.
12. Keller N., G. Raponi, I.M. Hoepelman, B.P. Overbeek, M. Rozenberg-Arska, and J. Verhoef. 1991. Effect of sub-minimal inhibitory concentrations of ciprofloxacin and fleroxacin on the bacterial capsular antigen and opsonophagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. Zentralbl Bakteriol. 274:4:519-26.
13. Lin Y.T., F.D. Wang, Y.J. Chan, Y.C. Fu, and C.P. Fung. 2014. Clinical and microbiological characteristics of tigecycline non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in Taiwan. BMC Infect Dis. 14:1. In press.
14. Lopes A.C.S., D.L. Veras, A.M.S. Lima, R.C.A. Melo, and J. Ayala. 2010. *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum β -lactamase genes and class 1

integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 105: 2:163-167.

15. Lu E., T. Trinh, T. Tsang, and J. Yeung. 2008. Effect of growth in sublethal levels of kanamycin and streptomycin on capsular polysaccharide production and antibiotic resistance in *Escherichia coli* B23. J Experiment Microbiol Immunol. 12:21-26.

16. Mammina, C., C. Bonura, A. Aleo, T. Fasciana, T. Brunelli, G. Pesavento, R. Degl'Innocenti, and A. Nastasi. 2012. Sequence type 101 (ST101) as the predominant carbapenem-non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* clone in an acute general hospital in Italy. Letters to the Editor. Int J Antimicrob Agents. 39:6: 539-547.

17. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1992. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Biotechnology. 24: 104-108.

18. Schembri, M.A., J. Blom, K.A. Krogfelt, and P. Klemm. 2005. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. Infect and Immun. 73:8: 4626-4633.

19. Veras, D.L., L.C. Alves, F.A.S. Brayner, D.R.D. Guedes, M.A.V. Maciel, C.R.C. Rocha, and A.C.S. Lopes. 2011. Prevalence of the *bla*_{SHV} gene in *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from hospital and community infections and from the microbiota of healthy individuals in Recife, Brazil. Curr Microbiol. 62:5: 1610-1616.

20. Wallace, K.M.P., K.M. Papp-Wallace, C.R. Bethel, A.M. Distler, C. Kasuboski, M. Taracila, and R.A. Bonomo. 2010. Inhibitor resistance in the KPC-2 β -lactamase, a preeminent property of this class A β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 54:2: 890–897.

21. Wang G., T. Huang, P.K. Surendraiah, K. Wang, R. Komal, J. Zhuge, C.R. Chern, A.A. Kryszuk, C. King, and G.P. Wormser. 2013. CTX-M β -lactamase-

producing *Klebsiella pneumoniae* in suburban New York City, New York, USA.
Emerg Infect Dis. 19:11:1803-10.

8. CONCLUSÕES

- Isolados de *K. pneumoniae* portadores de diferentes β -lactamases e resistentes a diferentes antimicrobianos β -lactâmicos podem sofrer alterações ultra-estruturais quando submetidos a sub-CIMs de drogas β -lactâmicas, sugerindo que possuem ação residual *in vitro* e suportando a idéia de que a produção de ESBL e KPC por isolados de *K. pneumoniae* não são capazes de evitar completamente a interação de antibióticos β -lactâmicos com seu alvo.

- A ceftazidima, o aztreonam e o imipenem, utilizados em concentrações clinicamente relevantes frente isolados resistentes de *K. pneumoniae*, são capazes de inibir a produção de CPS, o que pode contribuir para diminuir a expressão do fator de virulência mais importante desta espécie bacteriana.

- As alterações induzidas por antimicrobianos β -lactâmicos na estrutura e organização celular e na produção de CPS, o principal fator de virulência desta espécie bacteriana, traz embasamento teórico para a futura proposição de novas terapias combinadas utilizando β -lactâmicos para tratamento de infecções por isolados de *K. pneumoniae* MDR, produtores de ESBL e/ou KPC.

REFERÊNCIAS

- ADAMIS, G. et al. Pharmacokinetic interactions of ceftazidime, imipenem and aztreonam with amikacin in healthy volunteers. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.l.], v. 23, n. 2, p. 144-149, 2004.
- AHSMAN, M. J. et al. Pharmacokinetics of cefotaxime and desacetylcefotaxime in infants during extracorporeal membrane oxygenation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v. 54, n. 5, p.1.734-1.741, 2010.
- BAGLEY, S. T. Habitat association of *Klebsiella* species. **Infect Control**, [S.l.], v. 6, n. 2, p. 52-88, 1985.
- BEN-DAVID, D. et. al. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. **Clinical Microbiology and Infection**, [S.l.], v. 18, n.1, p. 54-60, 2012.
- BONNET, R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v. 48, n.1, p. 1-14, 2004.
- BONNET, R. et al. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240→Gly. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v. 45, n. 8, p. 2269-2275, 2001.
- BRADFORD, P. A. et al. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, Epidemiology, and Detection of this Important Resistance Threat. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.l.], v.14, n.4, p. 933-951. 2001.
- BRISSE S.; ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; GRIMONT, P. A. Molecular serotyping of *Klebsiella* species isolates by restriction of the amplified capsular antigen gene cluster. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], v.42, n.8, p. 3388-3398, 2004.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLMAN, B. C. (Orgs). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- BUIJS, J. et al. Continuous administration of PBP-2- and PBP-3-specific β -lactams causes higher cytokine responses in murine *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* sepsis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l.], v.59, n.5, p. 926-933, 2007.
- BUIJS, J. et al. Concentration-dependency of β -lactam-induced filament formation in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology and Infection**, [S.l.], v.14, n.4, p. 344–349, 2008.
- BULIK C. C. et al. Comparison of the activity of a human simulated, high-dose, prolonged infusion of meropenem against *Klebsiella pneumoniae* producing the KPC carbapenemase versus that against *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro

pharmacodynamic model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.I.], v.54, n.2, p. 804-810, 2010.

BULIK, C. C.; NICOLAU, D. P. Double-carbapenem therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.I.], v.55, n.6, p. 3002-3004, 2011.

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**, [S.I.], v.39, n.6, p.1211-1223, 1995.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.I.], v.54, n.3, p. 969-976, 2010.

BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. **Annual Review of Microbiology**, [S.I.], v.65, p. 455-478, 2011

BUSH, K. et al. Tackling antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, [S.I.], v.9, n.12, p. 894-896, 2011.

BUSH, K. Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes. **Revue Scientifique et Technique**, [S.I.], v.31, n.1, p. 43-56, 2012.

CARVALHAES, C. G. et al. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**; [S.I.], v. 65, n.2, p. 249–251, 2010.

CECCARELLI, G. et al. Successful ertapenem-doripenem combination treatment of bacteremic ventilator-associated pneumonia due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.I.], v.57, n.6, p. 2900-2901, 2013.

CHANAWONG, A. et al. 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**, [S.I.], v.46, n.3, p. 630-637, 2002.

CHAVES, J. et al. SHV-1 β -Lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.I.], v.45, n.10, p. 2856-2861, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement**. Pennsylvania-USA: CLSI, 2013.

COQUE, T. M. et al. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital Madrid, (1989 to 2000). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.I.], v. 46, n.2, p. 500-510, 2002.

CRESS, B.F. et al. Masquerading microbial pathogens: Capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. **FEMS Microbiology Reviews**, [S.l.], 2013. Não paginado.

DEANGELIS, P. L.; WHITE, C. L. Identification and molecular cloning of a heparosan synthase from *Pasteurella multocida* type D. **The Journal of Biological Chemistry**, [S.l.], v.277, n.9, p. 7209–7213, 2002.

DE CHAMPS C et al. Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum β -lactamase producing members of the family Enterobacteriaceae in an intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], v.27, n.12, p. 2887-2890, 1989.

DELONEY, C. R.; NEAL, S. Competition of various β -lactam antibiotics for the major penicillin-binding proteins of *Helicobacter pylori*: Antibacterial activity and effects on bacterial morphology. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v.43, n.11, p. 2702-2709, 1999.

DENISUIK, A. J. et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-, AmpC. β -lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007–11. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l.], v.68, Suppl 1, p. i57–i65, 2013.

DERRELL, C. M.; DAVID, L. P. Peptidoglycan syntesis in the absence of class A penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, [S.l.], v.45, n.4, p. 1423-1431, 2003.

DOMENICO, P. et al. Polysaccharide Capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, [S.l.], v.62, n.10, p. 4495-4499, 1994.

EMPEL, J. et al. Molecular Survey of β -Lactamases Conferring Resistance to Newer β -Lactams in Enterobacteriaceae Isolates from Polish Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v.52, n.7, p. 2449–2454, 2008.

FAVRE-BONTÉ, S. et al. *Klebsiella pneumoniae* capsule expression is necessary for colonization of large intestines of streptomycin-treated Mice. **Infection and Immunity**, [S.l.], v.67, n.11, p. 6152–6156, 1999.

FANG, C. T. *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. **Clinical Infectious Diseases**, [S.l.], v.45, n.3, p. 284-293, 2007.

FORD, R. C. et al. Structure-function relationships of the outer membrane translocon Wza investigated by cryo-electron microscopy and mutagenesis. **Journal of Structural Biology**, [S.l.], v.166, n.2, p. 172-182, 2009.

GANAL, S. et al. Effects of streptomycin and kanamycin on the production of capsular polysaccharides in *Escherichia coli* B23 cells. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, [S.l.], v. 11, p. 54-59, 2007.

GARCIA, D. O. et al. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v.52, n.5, p.1790-1793, 2008.

GUNKEL, A.G.; HECHLER, U.; MARTIN, H. H. State of penicillin-binding proteins and requirements for their bactericidal interaction with β -lactam antibiotics in *Serratia marcescens* highly resistant to extended-spectrum β -lactams. **Journal of General Microbiology**, [S.l.], v.137, n.2, p. 243–252, 1991.

HAEGGMAN, S. et al. Diversity and Evolution of the Class A Chromosomal β -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v. 48, n.7, p. 2400-2408, 2004.

HELD, T. K. et al. Effects of MICs and Sub-CIMs of antibiotics on production of capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v 39, n 5, p. 1093-1096, 1995.

HELD, T. K., et al. Binding to and Opsonophagocytic Activity of O-Antigen-Specific Monoclonal Antibodies against Encapsulated and Nonencapsulated *Klebsiella pneumoniae* serotype o1 strains. **Infection and Immunity**, [S.l.], v.68, n.5, p. 2402–2409, 2000.

HENNEQUIN, C.; FORESTIER, C. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. **Research in Microbiology**, [S.l.], v.158, n.4, p. 339-347, 2007.

HIRSCH, E. B. et al. Assessment of antimicrobial combinations for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase–producing *K. pneumoniae*. **The Journal of Infectious Diseases**, [S.l.], v.207, n.5, p. 786–793, 2013.

HORII, T. et al. An in-vitro study of carbapenem-induced morphological changes and endotoxin release in clinical isolates of gram-negative bacilli. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l.], v.41, n.4, p. 435-442, 1998.

JACKSON, J. J.; KROPP, H. β -lactam antibiotic-induced release of free endotoxin: in vitro comparison of penicillin-binding protein (PBP) 2-specific imipenem and PBP 3-specific ceftazidime. **The Journal of Infectious Diseases**, [S.l.], v.165, n.6, p.1033-1041, 1992.

JACOBY, G; BUSH, K. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. Disponível em < <http://www.lahey.org/studies/>>. Acesso em: 25 Jan. 2014.

JONES, C. H. et al. Pyrosequencing using the single-nucleotide polymorphism protocol for rapid determination of TEM- and SHV-type extended-spectrum β -

lactamases in clinical isolates and identification of the novel β -lactamase genes *bla*_{SHV-48}, *bla*_{SHV-105}, and *bla*_{TEM-155}. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.I.], v. 53, n.3, p. 977-986, 2009.

KELLER, N. et al. Effect of sub-minimal inhibitory concentrations of ciprofloxacin and fleroxacin on the bacterial capsular antigen and opsonophagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. **Zentralbl Bakteriologie**, [S.I.], v. 274, n.4, p. 519-526, 1991.

KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LASCOLS, C. et al. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.I.], v.57, n.1, p. 130-136, 2013.

LIN, Y.T. et al. Clinical and microbiological characteristics of tigecycline non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in Taiwan. **BMC Infectious Diseases**, [S.I.], v.14, n.1, p. 1, 2014.

LIVERMORE, D. M. et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.I.], v.59, n.2, p. 165-174, 2007.

LOPES, A. C. S. et al. *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, [S.I.], vol. 105. n.2, p. 163-167, 2010.

LU, E. et al. Effect of Growth in Sublethal Levels of Kanamycin and Streptomycin on Capsular Polysaccharide Production and Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* B23. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, [S.I.], v. 12, p. 21-26, 2008.

LYE, W.C. et al. Urinary tract infections in patients with diabetes mellitus. **Journal of Infections**, [S.I.], v.24, n. 2, p. 169-174, 1992.

MABILAT, C.; GOUSSARD, S. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases, p.553-559. In: PERSING, D.H. et al. (ed.), **Diagnostic molecular microbiology: principles and application**. Washington-USA: American Society for Microbiology, 1993.

MADSON, B. et al. Type 1 fimbrial shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* influence sugar binding specificities of their fimbriae H adhesions. **Infection and Immunity**, [S.I.], v. 62, n.3, p. 843-848, 1994.

MAMMINA, C. et al. Sequence type 101 (ST101) as the predominant carbapenem-non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* clone in an acute general hospital in Italy. Letters to the Editor. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.I.], v.39, n.6, p. 543-546, 2012.

MASSOVA, I.; MOBASHERY, S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v.42, n.1, p. 1–17, 1998.

MEATHERALL, B. L. et al. Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. **The American Journal of Medicine**, [S.l.], v.122, n.9, p. 866-873, 2009.

MCPHERSON, D. L.; POPHAM, D. L. Peptidoglycan synthesis in the absence of class A penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, [S.l.], v.185, n.4, p. 1423-1431, 2002.

MINARINI, L. A. et al. Prevalence of community-occurring extended spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Current Microbiology**, [S.l.], v.54, n.5, p. 335-341, 2007.

MINARINI, L. A. et al. Clonal Transmission of ESBL-Producing *Klebsiella* spp. at a University Hospital in Brazil. **Current Microbiology**, [S.l.], v.56, n.6, p.587-591, 2008.

MOLAND, E. S. et al. Occurrence of Newer β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from 24 U.S. Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v.46, n.12, p. 3837–3842, 2002.

MONTEIRO, J. et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v.53, n.1, p. 333-334, 2009.

NELSON, E. C.; SEGAL, H.; ELISHA, B. G. Outer membrane protein alterations and blaTEM-1 variants: their role in β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l.], v.52, n.6, p. 899-903, 2003.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**, [S.l.], v.17, n.10, p. 1791-1798, 2011.

PAGANI, L. et al. Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in Northern Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], v.41, n.9, p.4264-4269, 2003.

PAN, Y. J. et al. Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], v.46, n. 7, p. 2231-2240, 2008.

PAN, Y. J. et al. Capsular Types of *Klebsiella pneumoniae* Revisited by wzc Sequencing. **PLoS One**, [S.l.], v.8, n.12, 2013. Não paginado.

PEIRANO, G. et al. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l.], v.63, n.2, 265-268, 2009.

PODSCHUM, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella*. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.l.], v. 11, n.4, p. 589-603,1998.

POIREL, L. et al. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v.48, n.1, p.15-22, 2004.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β –Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.l.], v.20, n.3, p. 440–458, 2007.

QURESHI, Z.A. et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v.56, n.4, p. 2108-2113, 2012.

RAJESHWARI, H. et al. Morphological changes of *Klebsiella pneumoniae* in response to Cefotaxime: a scanning electron microscope study. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 25, n.12, p. 2263–2266, 2009.

RASHEED, J. K. et al. Evolution of extended-spectrum β -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v.41, n.3, p. 647-653, 1997.

ROBIN, F. et al. TEM-109 (CMT-5), a natural complex mutant of TEM-1 β -lactamase combining the amino acid substitutions of TEM-6 and TEM-33 (IRT-5). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v.49, n.11 p. 4443-4447, 2005.

ROBIN, F. et al. Evolution of TEM-type enzymes: biochemical and genetic characterization of two new complex mutant TEM enzymes, TEM-51 and TEM-52, from a single patient. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v.51, n.4, p.1304-1309, 2007.

ROSSOLINI, G. M.; D'ANDREA, M.M.; MUGNAIOLI, C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. **Clinical Microbiology and Infection**, [S.l.], v.14, Suppl. 1, p. 33-41, 2008.

SAHLY, H. et al. Impairment of respiratory burst in polymorphonuclear leukocytes by Extended-Spectrum Beta-Lactamase strains of *Klebsiella pneumoniae*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, [S.l.], v.23. n.1, p. 20-26, 2004.

SAIDEL-ODES, L.; BORER, A. Limiting and controlling carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Drug Resistance**, [S.l.], v.10, n.7, p. 9-14, 2013.

SALADIN, M. et al. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. **FEMS Microbiology Letters**, [S.l.], v.209, n.2, p. 161-168, 2002.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. **Biotechnology**, [S.l.], v.24, p.104-108, 1992.

SCHEMBRI, M. A., et al. Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, [S.l.], v.73, n.8, p. 4626-4633, 2005.

SHILO, S. et al. Risk factors for bacteriuria with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and its impact on mortality: a case-control study. **Infection**, [S.l.], v.41, n.2, p. 503-509, 2013.

SIROT, D. et al. A complex mutant of TEM-1 β -lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemother**, [S.l.], v.41, n.6, p. 1322-1325, 1997.

SOGUE, O. O. et al. CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase from Nigerian *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l.], v.57, n.1, p. 24-30, 2006.

SMITH MOLAND, E. et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l.], v.51, n.3, p. 711-714, 2003.

STEFANOVA, M. E. et al. *Neisseria gonorrhoeae* penicillin-binding protein 3 exhibits exceptionally high carboxypeptidase and β -lactam binding activities. **Biochemistry**, [S.l.], v.42, n.49, p. 14614-14625, 2003.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Eds.) **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRAUTMANN, M. et al. Antibiotic-induced release of endotoxin: in-vitro comparison of meropenem and other antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l.], v.41, n.2, p. 163-169, 1998.

TRIPATHI, K. D. **Farmacologia Médica**. 5ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2006.

TRISTRAM, S.G. et al. Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing isolates of *Haemophilus parainfluenzae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l.], v.61, n.3, p. 509-514, 2008.

TUMBARELLO, M. et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. **Clinical Infectious Diseases**, [S.l.], v.55, n.7, p. 943-950, 2012.

TZOUVELEKIS, L. S. et al.. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.l.], v.25, n.4, p. 682-707, 2012.

VERAS, D. L. et al. Prevalence of the *bla_{SHV}* Gene in *Klebsiella pneumoniae* Isolates Obtained from Hospital and Community Infections and from the Microbiota of Healthy Individuals in Recife, Brazil. **Current Microbiology**, [S.l.], v.62, n.5, p. 1610-1616, 2011.

VOULGARI, E. et al. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l.], *in press*, 2014.

WALLACE, K. M. P. et al. Inhibitor Resistance in the KPC-2 β -Lactamase, a Preeminent Property of This Class A β -Lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v. 54, n. 2, p. 890–897, 2010.

WANG, G. et al. CTX-M β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in suburban New York City, New York, USA. **Emerging Infectious Diseases**, [S.l.], v.19, n.11, p. 1803-1810, 2013.

WAXMAN, D. J.; YOCUM, R. R.; STROMINGER, J. L. Penicillins and cephalosporins are active site-directed acylating agents: evidence in support of the substrate analogue hypothesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B Biological Sciences**, [S.l.], v.289, n.1036, p. 257–271, 1980.

WEISENBERG, S. A. et al. Clinical outcomes of patients with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* after treatment with imipenem or meropenem. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S.l.], v.64, n.2, p. 233-235, 2009.

WHITFIELD, C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. **Annual Review of Biochemistry**, [S.l.], v.75, p. 39-68, 2006.

WHITFIELD, C.; NAISMITH, J.H. Periplasmic export machines for outer membrane assembly. **Current Opinion in Structural Biology**, [S.l.], v.18, n.4, p. 466-474, 2008.

WOODFORD, N. 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**, [S.l.], v.48, n.12, p. 4793-4799, 2004.

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v.45, n.4, p. 1151-1161, 2001.

APÊNDICE A - Artigo 1: submetido à Revista Microbiology

Ultrastructural changes in clinical and microbiota isolates of *Klebsiella pneumoniae* carriers of genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} or *bla*_{KPC} when subject to β -lactam antibiotics

Contents category: Cell and
Molecular Biology of Microbes.
Word Count - Summary: 250.
Word Count - Main text: 4,496.

Dyana Leal Veras ^{a, b, c, e *}
Ana Catarina de Souza Lopes ^c
Grasielle Vaz da Silva ^{a, b, d}
Gabriel Gazzoni Araújo Gonçalves ^{a, b}
Catarina Fernandes de Freitas ^{b, c}
Fernanda Cristina Gomes de Lima ^{b, c}
Maria Amélia Vieira Maciel ^c
Ana Paula Sampaio Feitosa ^{a, b, c}
Luiz Carlos Alves ^{a, b, d}
Fábio André Brayner ^{a, b, c}

^a Setor de Microscopia Eletrônica/Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-Universidade Federal de Pernambuco – LIKA/UFPE – Brasil. Postal address: Av. Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária - Recife - PE – Brasil. CEP: 50.670-901.

^b Departamento de Parasitologia – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ CPqAM-Fiocruz – Brasil. Postal address: Av. Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária - Recife - PE – Brasil. CEP: 50.670-420 Caixa Postal: 7472.

^c Departamento de Medicina Tropical – Universidade Federal de Pernambuco/UFPE. Postal address: Av. Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária - Recife - PE – Brasil. CEP: 50.670-901.

^d Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Pernambuco/UPE. Postal address: Rua Arnobio Marques, 310. Santo Amaro - Recife-PE – Brasil. CEP: 50.100-130.

^e Departamento de Enfermagem - Faculdade de Ciências Humanas de Olinda – FACHO. Postal address: Rod. PE-015, Jatobá – Olinda – PE – Brasil. CEP: 53.060-775.

*Correspondence address:

Dyana Leal Veras

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/Fiocruz

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

CEP: 50.670-420 Caixa Postal: 7472.

Telefone: +55 81 2101-2643/2101-2542. E-mail: dleal@cpqam.ficoruz.br

Summary

Klebsiella pneumoniae is one of the most common gram-negative microorganisms with multidrug-resistant profile, which difficulties the choice of antimicrobial therapy due the reduced therapeutic options. Hence, as alternative, new studies should be developed, wherein old and discarded antibiotics should be reinvestigated. Acknowledging that the β -lactam antibiotics are the most commonly prescribed antibacterial agents, the objective of this study was to characterize ultrastructural effects caused by these antibiotics in *K. pneumoniae* isolates. Three clinical isolates of *K. pneumoniae* were selected for the study, with resistance profile to third generation cephalosporins, aztreonam and/or imipenem, with different resistance genes for ESBLs or KPC. Two isolates of *K. pneumoniae* obtained in the microbiota were also analyzed, both resistant to ampicillin and amoxicillin. According to the susceptibility profile, clinical isolates were submitted to sub-MICs of cefotaxime, ceftazidime, aztreonam and imipenem, and those from the microbiota to ampicillin and amoxicillin for analysis by scanning electron and transmission microscopy. The isolates from *K. pneumoniae* showed different morphological and ultrastructural changes after submission to β -lactams tested in different concentrations, such as cell filamentation and loss of cytoplasmic material and deformation of dividing septa. Our results demonstrate that isolates from *K. pneumoniae* carrying encoding genes of different β -lactamases, have cell changes when subjected to different β -lactam antibiotics, suggesting that they have residual in vitro action in the isolates analyzed and supporting the idea that the production of ESBL and KPC by isolates from *K. pneumoniae* are not able to completely prevent the interaction of β -lactam antibiotics with their target.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, resistance genes, ESBL, KPC, electron microscopy.

Introduction

Klebsiella pneumoniae is one of the most common multidrug-resistant gram-negative microorganisms (MDR) found worldwide, responsible for high morbidity and mortality both in hospitals and other health facilities (Mammina *et al.*, 2012).

The β -lactam antibiotics are the most commonly prescribed antibacterial agents due to the high efficiency of its action mechanism and low toxicity (Haeggman *et al.*, 2004). The Penicillin Binding Proteins (PBPs) are lethal targets of β -lactam antibiotics in susceptible bacteria and their inhibition leads to bacterial cell wall degradation and eventual cell lysis (Stefanova *et al.*, 2003).

Every PBP has a specific role in the proliferation and maintenance of bacterial morphology where the block of PBP-1 leads to rapid bacterial lysis, the PBP-2 block leads to formation of spherical cells, while PBP-3 leads to formation of long filaments caused by inability to dividing septa formation after the duplication of bacterial cell mass (Buijs *et al.*, 2008, Horii *et al.*, 1998, Jackson & Kroop, 1992). Several studies report different bacterial morphological changes caused by sub-Minimum Inhibitory Concentrations (sub-MICs) of third-generation cephalosporins and carbapenems in susceptible isolates of various bacterial species, due to differences in the affinity of β -lactams to PBPs (Buijs *et al.*, 2008, Horii *et al.*, 1998, Jackson & Kroop, 1992).

The production of β -lactamases is the most common and important mechanism of resistance of pathogenic bacteria against β -lactam antibiotics

(Haeggman *et al.*, 2004). The classic β -lactamases are enzymes capable of inactivating penicillins and narrow-spectrum cephalosporins before reaching their target (Robin *et al.*, 2005). Most isolates of *K. pneumoniae* carries the gene for chromosomal β -lactamase of class A SHV-1, which has limited activity against ampicillin, not hydrolyzing β -lactam antibiotics of broad-spectrum (Nelson *et al.*, 2003). The presence of this gene has been previously studied in isolates of *K. pneumoniae* derived from the microbiota of individuals without bacterial infection (Veras *et al.*, 2011).

The introduction into clinical practice of oxyimino-cephalosporins for treatment of infections caused by gram-negative bacteria was briefly followed by the emergence of Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBLs) derived from the classical β -lactamase SHV-1, TEM-1 and TEM-2, conferring resistance to third-generation cephalosporins and monobactams such as aztreonam (Haeggman *et al.*, 2004). Currently, more than 180 variants of the gene *bla*_{SHV} and more than 210 *bla*_{TEM} have been reported (Jacoby & Bush, 2013). Another group of ESBL which has a high profile of hydrolysis against cefotaxime with less than 40% identity to SHV and TEM enzymes is the group of CTX-M enzymes, widely found in different species of the family Enterobacteriaceae, including *K. pneumoniae* (Saladin *et al.*, 2002).

The treatment of infections by isolates from *K. pneumoniae* producer of ESBLs is limited to the use of the few antibiotics available; the carbapenems being often the last line of effective treatment for these infections (Lascols *et al.*, 2013). However, the production of class A carbapenemase, KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase), a broad-spectrum β -lactamase has been listed as the primary form of carbapenem resistance in this bacterial species, being reported 15 variants with dissemination in different parts of the world (Jacoby & Bush, 2013).

The production of these β -lactamases in clinical isolates of *K. pneumoniae* has represented a major problem in many countries, hindering the therapeutic options available to treat infections caused by this bacterial species.

The increasing prevalence of antibiotic resistant bacteria portends an impending post-antibiotic age, characterized by diminishing efficacy of common antibiotics and routine application of complementary therapeutic approaches to treat bacterial infections (Cress *et al.*, 2013). Therefore, new approaches should be developed, wherein old and discarded, or even rejected, antibiotics should be reinvestigated, repurposed and used as needed (Bush *et al.*, 2011).

In this thought, a recent study demonstrated the in vitro and in vivo action of therapy combinations of β -lactam antibiotics and aminoglycosides in isolates of *K. pneumoniae* MDR, aiming at identifying new options for treatment of infections with this bacterial species (Hirsch *et al.*, 2013). However, no study has demonstrated the change induced by different β -lactam antibiotics in bacterial cell structure isolated from *K. pneumoniae* MDR.

K. pneumoniae isolates resistant to cefotaxime when subjected to sub-MIC this antibiotic showed damage on the cellular surface, besides filamentation by a dose-dependent adaptive process, due to the stressful environment promoted by the presence of the antibiotics, which could contribute to therapeutic effects (Rajeshwari *et al.*, 2009).

However, the modification of the bacterial morphology due to subjection to β -lactam antibiotics has been associated in many studies with the increased release of free endotoxin, which could cause damage to the host (Buijs *et al.*, 2008, Horii *et al.*, 1998, Jackson & Kroop, 1992).

Unfortunately, there is little information on the effects caused by β -lactam antibiotics in the cellular structure of bacterial isolates of *K. pneumoniae* MDR carrying of important resistance genes such as *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{KPC}, as well as the effect of these antibiotics on isolates from the microbiota of individuals without bacterial infection. Therefore, the aim of this study was to characterize the morphological and ultrastructural effects caused by β -lactam antibiotics widely used in clinical medicine on isolates of pathogenic and non-pathogenic *K. pneumoniae*, carrying encoding genes of classic β -lactamases, ESBL and KPC.

Material and Methods

Bacterial isolates

For this study we selected five isolates of *K. pneumoniae* from Recife - PE, Brazil (Tables 1 and 2). The microbiota isolates K21.1-F and K58.1-F were obtained from feces of children who had no bacterial infection. These isolates exhibit resistance or intermediate resistance to ampicillin and/or amoxicillin but do not have the gene *bla*_{SHV} (Table 1) (Veras *et al.*, 2011). Three clinical isolates of *K. pneumoniae* obtained in public hospitals in Recife were used: K3C, K16R and K652. The susceptibility profile and the presence of genes *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} was determined in previous studies on the isolates K3C and K16R (Veras *et al.*, 2011, Lopes *et al.*, 2010), which showed resistance to cefotaxime, ceftazidime and aztreonam, according to the interpretive criteria of CLSI, 2013.

The isolate K3C has the gene *bla*_{SHV-11} and the isolate K16R has the genes *bla*_{SHV-1} and *bla*_{CTX-M2} (Veras *et al.*, 2011, Lopes *et al.*, 2010). The isolate K652, firstly

studied in this work, was obtained by surveillance research from rectal swabs of individuals without clinical symptoms of bacterial infection, admitted to a public hospital in 2011. The identification and susceptibility profile of this isolate to different antimicrobials was determined by automated system VITEK 2 (BioMerieux) and confirmed manually against cefotaxime, ceftazidime and imipenem (Sigma Aldrich) by the broth macrodilution test according to the CLSI recommendations, 2013.

DNA extraction and PCR amplification

The genomic DNA of isolates of *K. pneumoniae* was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) according to manufacturer's instructions. The presence of *bla*_{TEM} gene was investigated by PCR in isolates of microbiota and the three clinical isolates using primers T1: 5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA -3' and T2: 5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC-3' (Mabilat & Goussard, 1993). The strain K652 was also evaluated by PCR for the presence of *bla*_{SHV} and *bla*_{KPC} using primers 5'-GGTTATGCGTTATATTCGCC-3' and 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3' (Rasheed *et al.*, 1997); and KPC1F: 5'-GCTACACCTAGCTCCACCTTC-3' and KPC1R: 5'-ACAGTGGTTGGTAATCCATGC-3' (Moland *et al.*, 2002), respectively.

DNA sequencing

The sequencing of PCR products of the genes *bla*_{TEM} and *bla*_{KPC} was performed using Applied Biosystems automated sequencer - Hitachi, after purification of PCR amplicons with PureLink Micro Kit (Invitrogen) according to manufacturer's

instructions. The *bla*_{TEM} gene was sequenced in isolates K3C and K16R due presenting phenotypic resistance to third-generation cephalosporins tested. Only *bla*_{KPC} gene was sequenced in the isolate K652, once this has phenotypic resistance to carbapenems. The primers were the same as used for PCR plus the TEMup21: 5'-TCCCTTTTTTGC GG CATT TTTGC-3' and TEMdwn280: 5'-CAGTGAGGCACCTATCTC-3' (Jones *et al.*, 2004), for *bla*_{TEM}; and KPC F: 5'-GAGCTGAACTCCGCCATC-3'; and KPC R: 5'-TATTTTCCGAGATGGGTGAC-3' (Yigit *et al.*, 2001), for *bla*_{KPC}.

The DNA sequence analysis and multiple alignment was performed using the programs DNASTar and BLAST. The sequences of the genes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-15} and *bla*_{KPC-2} were deposited in the GenBank database under accession numbers KF906436, KF906435 and KF906437, respectively.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

For the analysis of the action of antibiotics on isolates of *K. pneumoniae*, they were subjected to different sub-MIC of ampicillin, amoxicillin, ceftazidime, cefotaxime, imipenem and aztreonam (Sigma Aldrich) according to the origin and susceptibility profile of each isolate using clinically relevant concentrations (Tables 1 and 2) (Adamis *et al.*, 2004, Ahsman *et al.*, 2010).

In all processing were included a control of isolate from the same conditions and dilutions, without the presence of the antibiotics. The isolates were cultured for 18 hours at 37 °C (310.15K). After growth the bacterial cells were centrifuged and fixed with 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde (Sigma Aldrich). The cells were post-fixed in 1% osmium tetroxide then contrasted in 5% uranyl acetate

(Electron Microscopy Science). Dehydration was carried out using acetone (Sigma Aldrich) with posterior infiltration and embedding of samples in 812 epon resin (Electron Microscopy Sciences). Samples were viewed under transmission electron microscope ZEISS EM109.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

The isolates of *K. pneumoniae* were subjected to antimicrobial agents using the criteria and concentrations described above (Tables 1 and 2). After growth, the bacterial cells were centrifuged gently and fixed with 2.5% glutaraldehyde (Sigma Aldrich). The post-fixation was performed with 1% osmium tetroxide (Electron Microscopy Science) with subsequent dehydration using ethanol (Sigma Aldrich). After dehydration, the material was dried and metalized to visualization of bacterial cells under scanning electron microscope JEOL JSM-5600 LV.

Results

Antimicrobial susceptibility

The isolate of *K. pneumoniae* K652 was resistant to all antibiotics tested by the VITEK 2 system (ampicillin, ampicillin/sulbactam, aztreonam, cefalotin, cefepime, cefotaxime, cefoxitin, ceftazidime, ciprofloxacin, ertapenem, gentamicin, imipenem, meropenem piperacillin/tazobactam), except amikacin and tigecycline. The completion of the broth macrodilution test confirmed the resistance of this isolate against cefotaxime, ceftazidime and imipenem, with MICs $\geq 256 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Presence of genes bla_{SHV}, bla_{TEM} and bla_{KPC}

PCR analysis identified the presence of the gene *bla_{TEM}* in the three clinical isolates of *K. pneumoniae* and the isolate K21.1-F from microbiota. Additionally, *bla_{SHV}* and *bla_{KPC}* genes were also identified by PCR in the K652 isolated from *K. pneumoniae*.

Sequencing of genes bla_{TEM} and bla_{KPC}

The *bla_{TEM-1}* gene was identified in the isolate K16R from *K. pneumoniae* that also has the *bla_{CTX-M2}* gene (Lopes *et al.*, 2010). The *bla_{TEM}* gene found in K3C has nucleotide change compared to *bla_{TEM-1}* gene at position 512 G→A and 914 G→A, leading to replacement of Glu-104→Lys and Gly-238→Ser. Amino acid substitutions reported were found previously for *bla_{TEM-15}* (Sirot *et al.*, 1997, Tristram *et al.*, 2008). The gene *bla_{KPC}* identified in the isolate K652 from *K. pneumoniae* has 100% similarity with *bla_{KPC-2}* published on the GenBank database under the access number AY034847 (Smith Moland *et al.*, 2003).

Ultrastructural and morphological analyses

Cells isolated from *K. pneumoniae* control, analyzed without submission to β -lactam antibiotics, showed preserved morphology with intact cell wall and cytoplasmic contents with electrondense aspect through analysis by TEM, being possible to observe the presence of ribosomes and genetic material distributed by

the bacterial cytoplasm. The cells in process of division showed formation of septa without irregularities, Fig. 1(a), Fig. 2(a), Fig. 3(a). The SEM analysis showed conserved bacterial morphology in form of rod and cell growth on average between 1.5 to 3µm, Fig. 4(a-b), Fig. 5(a) e 6(a).

Isolate K16R

Despite the isolate K16R showing resistance to cefotaxime, ceftazidime and aztreonam and having the genes *bla*_{SHV-1}, *bla*_{TEM-1} and *bla*_{CTX-M2}, the submission of this isolate to sub-MICs of these antimicrobials triggered differentiated cellular events from cell control. After submission to the concentrations of cefotaxime 32 and 64 µg ml⁻¹, cells were observed with increased periplasmic space across the cell extension stronger at the end of the cells, suggesting a decreased or retraction of cell cytoplasmic content, Fig. 2(b). There were no morphological changes significant in cell size in the SEM analysis, Fig. 5(b).

Submission of the isolate K16R to 8 and 16 µg ml⁻¹ of ceftazidime allowed the identification of morphological changes and cellular organization by TEM and SEM, where several elongated cells were visualized. Through the TEM one can see that this event occurred due to incomplete cell divisions, identified by the presence of several consecutive dividing septa completion. Some cells also showed cell membrane spaces inside the bacterial cytoplasm having identical cytoplasmic content to the rest of the cell ribosomes and genetic material equally distributed, Fig. 2(c-e). This event suggests no cell division, enabling the formation of membrane compartments inside the bacterial cells. There was also structural disorganization of the cytoplasmic membrane continuity of some cells and decreased amount of

bacterial cytoplasm. Through the SEM it was possible to identify cells with more than 15µm long, Fig. 5(c)

After submitting the isolate K16R to 4 µg ml⁻¹ of aztreonam, some cells showed large electronlucent spaces in bacterial cytoplasm with decreased cytoplasmic mass, Fig. 2(f-h). There were no morphological changes or in cell size according to the SEM, Fig. 5(d).

Isolate K3C

The isolate K3C from *K. pneumoniae* also has phenotypic resistance to cefotaxime, ceftazidime and aztreonam, and it has *bla*_{SHV-11} e *bla*_{TEM-15} genes. After submitting this isolate to 32 and 64 µg ml⁻¹ of cefotaxime, some cells showed decreased cytoplasmic material with formation of membrane compartments within cells, which have internal material containing ribosomes. These cells showed disorganization of the cytoplasmic membrane. Several cells also contained a large number of electronlucent non-membrane structures in their cytoplasm near the cell membrane at both concentrations tested, Fig. 1(b-c). There were no morphological changes or in cell size according to the SEM, Fig. 6(b).

Several filamentous cells were visualized after submission of the isolate K3C to 16 e 32 µg ml⁻¹ of ceftazidime thorough the TEM and SEM. According to the TEM, it can be observed that the cell elongation was accompanied by decreased or retraction of cytoplasmic material in the middle of dividing cell or end cells already separated. The presence of a large electronlucent space between the cytoplasmic membrane and cell wall of these cells highlights the presence of membraned cellular

compartments containing cytoplasmic material, Fig. 1(d). Through the SEM it was possible to observe cells with 18µm long, Fig. 6(c).

The cellular events induced by this aztreonam in this isolate at 16 and 32 µg ml⁻¹ were discrete, with some cells showing large number of non-membrane electronlucent spaces membrane in the bacterial cytoplasm, similar to that found after treatment with cefotaxime, Fig. 1(e). Most cells, however, showed conservation of morphology preserving the cytoplasmic membrane and cell wall. There were no morphological changes or in cell size according to the SEM (Fig. 6(d)).

Isolate K652

The isolate K652 of *K. pneumoniae* has the gene *bla*_{KPC-2} and shows high phenotypic resistance to carbapenems and third-generation cephalosporins. Submission of this isolate both the ceftazidime at 27 µg ml⁻¹ as imipenem at 16 µg ml⁻¹ promoted cell filamentation in analysis performed by SEM, being possible to observe cells larger than 50 µm, Fig. 4(e-i). The number of elongated cells was apparently higher with submission to imipenem compared to ceftazidime, Fig. 3(d-h). The TEM analysis of the isolated K652 subjected to these antibiotics demonstrate that most of cells showed formation of consecutive dividing septa without completing the division process. Many cells also showed elongation and disruption of the cytoplasmic membrane and cell wall at the site of cell division, promoting a resilient aspect of these cellular components.

Through the SEM several rods can be observed originating cells undeveloped cocci- shaped cells after submitting K652 to 98 µg ml⁻¹ of cefotaxime, Fig. 4(c-d). The

TEM has confirmed some spherical cells being formed from rod-shaped cells with abnormal density of bacterial cytoplasm, Fig. 3(b-c).

Isolates K58.1-F and K21.1-F

The results of the analysis by the TEM and SEM of isolates from *K. pneumoniae* derived from microbiota after submission to amoxicillin and ampicillin were quite similar to those isolates obtained in hospital environment when submitted to cefotaxime and aztreonam.

The isolate K58.1-F, which shows phenotypic resistance to amoxicillin and intermediate resistance to ampicillin, when exposed to sub-MICs of these antibiotics (Table 2) showed increased electronlucent spaces at the end of cells in comparison with the control according to the TEM, suggesting decreased cytoplasmic contents. The large amount of electronlucent spaces and non-membrane electrondense structures has also been identified in bacterial cytoplasm of several cells, Fig. 7(b-c). These cellular events were increased in accordance with the highest concentration of each drug used, showing a dose-dependent correlation.

Despite the isolate K21.1-F showing higher MICs for amoxicillin and ampicillin compared to the isolate K58.1-F, the analysis by TEM after submission to sub-MICs of these antibiotics showed similar results between the two isolates. Large amount of electronlucent spaces and non-membrane electrondense structures in the bacterial cytoplasm of several cells isolated from K21.1-F, even in the lowest concentration tested ($0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$), Fig. 7(a). Multiple cells with irregular formation of septa during bacterial division were observed simultaneously, without loss of cytoplasmic contents even at higher concentrations, Fig. 7. The analysis through SEM showed no

significant changes in any concentration of antibiotics tested in isolates K21.1-F and K58.1-F.

Discussion

The production of β -lactamases is a major mechanism of resistance among isolates of Enterobacteriaceae family, especially ESBL and KPC, which are frequently found in clinical isolates of *K. pneumoniae*, conferring resistant phenotype to the main β -lactam antibiotics used in clinical medicine.

The genes *bla*_{TEM-15}, *bla*_{CTX-M2} and *bla*_{KPC-2}, found respectively in the isolates K3C, K16R and K652, encode enzymes of the type ESBL and carbapenemase. These genes have previously been reported in different bacterial species (Monteiro *et al.*, 2009, Peirano *et al.*, 2009, Sirot *et al.*, 1997). The change of Glu-104→Lys and Gly-238→Ser of *bla*_{TEM-15} gene is known to be conducive to increased fixation of substrate and enzyme active site, determining an enzyme with increased catalytic efficiency and affinity for oxyimino cephalosporins (Sirot *et al.*, 1997). In addition, the ESBL CTX-M belonging to phylogenetic group CTX-M2 is one of the enzymes CTX-M type most commonly found in isolates of Enterobacteriaceae in Brazil (Peirano *et al.*, 2009), featuring high power of hydrolysis against third-generation cephalosporins, cefotaxime especially.

The β -lactamase KPC-type efficiently hydrolyze penicillins, cephalosporins, carbapenems and aztreonam, being inhibited by clavulanic acid and tazobactam (Peirano *et al.*, 2009). The isolate K652 has the resistance gene *bla*_{KPC-2}, and show high phenotypic resistance to carbapenems and third-generation cephalosporins. In Brazil, the gene *bla*_{KPC-2} was detected for the first time in *K. pneumoniae* isolates

obtained from patients admitted to hospitals in Recife – PE (Monteiro *et al.*, 2009). The presence of this resistance gene was further detected in isolates of *K. pneumoniae* obtained from other Brazilian areas (Peirano *et al.*, 2009, Monteiro *et al.*, 2009).

Cases of infections by isolates producer of these enzymes bring enough concern about the most appropriate antibiotic therapy. This is because bacterial growth often does not change, there being no cell death due to the submission to β -lactams. In this context, this study aimed at demonstrating the in vitro effect of imipenem, penicillins, third generation cephalosporins and aztreonam in isolates from *K. pneumoniae* MDR and microbiota obtained from patients under different clinical conditions. This variability allowed the analysis of the effects of β -lactam antibiotics on isolates with distinct genetic and phenotypic resistance profiles able to assume different developments front host organisms.

The submission of isolates K3C, K16R and K652 to the different concentrations of ceftazidime and the isolate K652 to imipenem promoted cell filamentation in all isolates analyzed, with the formation of several consecutive septa and disorganization of the membrane and cell wall in various cells. The submission of sensitive isolates of *P. aeruginosa* to sub-MICs of ceftazidime and imipenem leads to inhibition of PBP-2 and PBP-3, respectively (Jackson & Kroop, 1992). The binding of antibiotics to PBP-3 inhibits the septa formation predisposing to filament formation due to the cell inability to complete the division process after doubling the bacterial mass (Buijs *et al.*, 2008, Horii *et al.*, 1998).

Isolates from *Serratia marcescens* with high and low resistance to cefotaxime, ceftazidime and aztreonam due to overproduction of chromosomal β -lactamase had the PBP 3 inhibited with high sensitivity to these antibiotics even at concentrations

lower than MIC, concluding that the overproduction of these enzymes did not prevent the binding of antibiotics to their target (Gunkel *et al.*, 1991). In this study, the presence of bacterial filaments and cell disruption presented by isolates from *K. pneumoniae* after submission to ceftazidime and imipenem leads us to believe that there was binding and inhibition of PBPs essential to the process of cell division by these antibiotics, despite the production of ESBLs and KPC.

In a study by Rajeshwari *et al.* (2009), the formation of bacterial filaments in isolates of resistant *K. pneumoniae* due to submission to cefotaxime was deemed stressful for promoting elongation and deformation of bacterial cells. This event was probably attributed to the inhibition of mucopeptide synthesis due PBPs fixing and inhibition by antibiotics, which may reduce the stability of the bacterial cell wall, predisposing cells to lyse (Rajeshwari *et al.*, 2009). Other studies showed, however, that the formation of bacterial filaments increase the release of endotoxin, being considered an additional risk during the empiric treatment of severe infections for predisposing the increased inflammation in sepsis (Buijs *et al.*, 2008, Jackson & Kroop, 1992).

In this work, the submission of nosocomial isolates to cefotaxime was not able to promote cell filamentation, but increased periplasmic space with membrane structures containing cytoplasmic material in various cells. Additionally, the isolate K652 subjected to cefotaxime showed morphological changes with reduced cell size and spherical.

Due to the great need for effective therapeutic options for the treatment of bacterial isolates MDR new therapeutic combinations have been tested. Recently, Hirsch *et al.* conducted a study that showed meropenem and amikacin in combination able to inhibit in vitro and in vivo growth of resistant strains of *K.*

pneumoniae producing KPC-2 and KPC-3 (Hirsch *et al.*, 2013). In the present study, it can be determined that imipenem and ceftazidime alone were able to promote in vitro cellular changes including loss of cytoplasmic material, filamentation and membrane disorganization and cell wall at the division site. Knowledge the effect of antibiotics alone front isolates from *K. pneumoniae* MDR is extremely important to understand how the development of combined therapies can effectively contribute to the treatment of infections caused by these isolates.

Each β -lactam antibiotic has a specific affinity for one type PBP where cefotaxime and ceftazidime in low concentrations inhibit PBP3, resulting in the formation of filaments, and when at high concentrations these antibiotics inhibit PBP1, resulting in death of bacterial cells sensitive to these antibiotics (Buijs *et al.*, 2008).

However, in murine sepsis model, the affinity of β -lactam antibiotic to different PBPs did not determine filament formation in susceptible isolates of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* subjected to ceftazidime, but the dosage regimen used to treat infection with this antibiotic (Buijs *et al.*, 2007), probably due to fluctuations of plasmatic levels. Apparently, in the present work, resistant isolates of *K. pneumoniae* subjected to concentrations of β -lactam antibiotics clinically relevant have similar response to that of sensitive cells at low concentrations of these antibiotics.

Deloney & Schiller (1999) using sensitive isolates of *Helicobacter pylori* subjected to sub-MICs of β -lactam antibiotics, including ampicillin and aztreonam showed that the bacterial cells became filamentous when subjected to aztreonam and spherical after submission to other β -lactam. The data presented here show that aztreonam was not able to induce cell filamentation in clinical isolates tested, but the

appearance of electronlucent spaces suggesting loss of cytoplasmic contents, as well as ampicillin and amoxicillin in the isolates from the microbiota.

Despite the β -lactam antibiotics tested having the ability to cause changes in the isolates of *K. pneumoniae* used in this study, these antibiotics are not able to interfere with the survival of isolates with resistant phenotype, perhaps due to the inability to inhibit more than one PBP type essential for bacterial growth, a fundamental requirement for the bactericidal effect of β -lactam antibiotics (Gunkel *et al.*, 1991).

Our results show that isolates of *K. pneumoniae* having different β -lactamases and resistant to different β -lactam antimicrobials can undergo ultrastructural changes when subjected to sub-MICs of β -lactam drugs, suggesting that they have residual effects in vitro on the isolates analyzed, supporting the idea that production of ESBL and KPC by isolates of *K. pneumoniae* are not able to completely prevent the interaction of β -lactam antibiotics with their target.

Acknowledgments

We are grateful to the Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde – PDTIS of the Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ and to the Núcleo de Plataformas Tecnológicas of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ, particularly to Msc. Viviane Carvalho and Dr. Cássia Docena for technical assistance.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

References

1. Adamis, G, Papaioannou, M. G., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Gargalianos, P., Kosmidis, J. & Giamarellou, H. (2004). Pharmacokinetic interactions of ceftazidime, imipenem and aztreonam with amikacin in healthy volunteers. *Int J Antimicrob Agents* **23**, 2, 144-149.
2. Ahsman, M. J., Wildschut, E. D., Tibboel, D. & Mathot, R. A. (2010). Pharmacokinetics of cefotaxime and desacetylcefotaxime in infants during extracorporeal membrane oxygenation. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 5, 1734-1741.
3. BLAST. Basic Local Alignment Search Tool [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]
4. Buijs, J., Dofferhoff, A. S., Mouton, J. W. & Van der Meer, J.W. (2007). Continuous administration of PBP-2- and PBP-3-specific β -lactams causes higher cytokine responses in murine *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* sepsis. *J Antimicrob Chemother* **59**, 5, 926-933.
5. Buijs, J., Dofferhoff, A. S. M., Mouton, J. W., Wagenvoort, J. H. & Van der Meer, J. W. (2008). Concentration-dependency of β -lactam-induced filament formation in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **14**, 4, 344-349.
6. Bush, K., Courvalin, P., Dantas, G., Davies, J., Eisenstein, B., Huovinen, P., Jacoby, G. A., Kishony, R., Kreiswirth, B. N. & other authors. (2011). Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* **9**, 12, 894-6.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement*. Wayne,

PA: CLSI: Document M100-S15.

8. Cress, B. F., Englaender, J. A., He, W., Kasper, D., Linhardt, R. J. & Koffas, M. A. (2013). Masquerading microbial pathogens: Capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. *FEMS Microbiol Rev.* In press.
9. Deloney, C. R. & Schiller, N. L. (1999). Competition of various β -lactam antibiotics for the major penicillin-binding proteins of *Helicobacter pylori*: antibacterial activity and effects on bacterial morphology. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 11, 2702-2709.
10. Gunkel, A. G., Hechler, U. & Martin, H. H. (1991). State of penicillin-binding proteins and requirements for their bactericidal interaction with β -lactam antibiotics in *Serratia marcescens* highly resistant to extended-spectrum β -lactams. *J Gen Microbiol* **137**, 2, 243–252.
11. Haeggman, S., Lofdahl, S., Paauw, A., Verhoef, J. & Brisse, S. (2004). Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 7, 2400-2408.
12. Hirsch, E. B., Guo, B., Chang, K., Cao, H., Ledesma, K. R., Singh, M. & Tam, V. H. (2013). Assessment of antimicrobial combinations for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase–producing *K. pneumoniae*. *J Infect Dis* **207**, 5, 786-793.
13. Horii, T., Kobayashi, M., Sato, K., Ichiyama, S. & Ohta, M. (1998). An in-vitro study of carbapenem-induced morphological changes and endotoxin release in clinical isolates of gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother* **41**, 4, 435-442.
14. Jackson, J. J. & Kropp, H. (1992). β -lactam antibiotic-induced release of free endotoxin: in vitro comparison of penicillin-binding protein (PBP) 2-specific imipenem and PBP 3-specific ceftazidime. *J Infect Dis* **165**, 6, 1033-1041.
15. Jacoby, G. & Bush, K. (2013). β -Lactamase Classification and Amino Acid

Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes [<http://www.lahey.org/studies>].

16. Jones, C. H., Ruzin, A., Tuckman, M., Visalli, M. A., Petersen, P.J. & Bradford, P. A. (2009). Pyrosequencing using the single-nucleotide polymorphism protocol for rapid determination of TEM- and SHV-type extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates and identification of the novel β -lactamase genes *bla*_{SHV-48}, *bla*_{SHV-105}, and *bla*_{TEM-155}. *Antimicrob Agents and Chemother* **53**, 3, 977–986.
17. Lascols, C., Peirano, G., Hackel, M., Laupland, K. B. & Pitout, J. D. (2013). Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob Agents and Chemother* **57**, 1, 130-136.
18. Lopes, A. C. S., Veras, D. L., Lima, A. M. S., Melo, R. C. A. & Ayala, J. (2010). *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **105**, 2, 163-167.
19. Mabilat, C. & Goussard, S. (1993). PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases. In *Diagnostic Molecular Microbiology: principles and applications*. Edited by Persing, D. H., Smith, T. F., Tenover, F. C. & White, T.J. Washington: American Society for Microbiology, 553-559.
20. Mammina, C., Bonura, C., Aleo, A., Fasciana, T., Brunelli, T., Pesavento, G., Degl'Innocenti, R. & Nastasi, A. (2012). Sequence type 101 (ST101) as the predominant carbapenem-non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* clone in an acute general hospital in Italy. Letters to the Editor. *Int J Antimicrob Agents* **39**, 6, 543-545.
21. Moland, E. S., Black, J. A., Ourada, J., Reisbig, M. D., Hanson, N. D. & Thomson,

- K. S. (2002). Occurrence of newer β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 U.S. hospitals. *Antimicrob Agents and Chemother* **46**, 12, 3837–3842.
22. Monteiro, J., Santos, A. F., Asensi, M. D., Peirano, G. & Gales, A. C. (2009). First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents and Chemother* **53**, 1, 333-334.
23. Nelson, E. C., Segal, H. & Elisha, B. G. (2003). Outer membrane protein alterations and *bla*_{TEM-1} variants: their role in β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* **52**, 6, 899-903.
24. Peirano, G., Seki, L. M., Val Passos, V. L., Pinto, M. C., Guerra, L. R. & Asensi, M. D. (2009). Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother* **63**, 2, 265–268.
25. Rajeshwari, H., Nagveni, S., Oli, A., Parashar, D. & Chandrakanth, K. R. (2009). Morphological changes of *Klebsiella pneumoniae* in response to cefotaxime: a scanning electron microscope study. *World Journal Microbiol Biotechnol* **25**, 2263–2266.
26. Rasheed, J. K., Jay, C., Metchock, B., Berkowitz, F., Weigel, L., Crellin, J., Steward, C., Hill, B., Medeiros, A. A. & Tenover, F. C. (1997). Evolution of extended-spectrum β -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents and Chemother* **41**, 3, 647–653.
27. Robin, F., Delmas, J., Chanal, C., Sirot, D., Sirot, J. & Bonnet, R. (2005). TEM-109 (CMT-5), a natural complex mutant of TEM-1 β -lactamase combining the amino acid substitutions of TEM-6 and TEM-33 (IRT-5). *Antimicrob Agents and*

- Chemother* **49**, 11, 4443-4447.
28. Saladin, M., Cao, V. T. B., Lambert, T., Donay, J. L., Herman, J. L., Ould-Hocine, Z., Verdet, C., Delisle, F., Philippon, A. & Arlet, G. (2002). Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett* **209**, 2, 161-168.
29. Sirot, D., Recule, C., Chaibi, E. B., Bret, L., Croize, J., Chanal-Claris, C., Labia, R. & Sirot, J. (1997). A complex mutant of TEM-1 β -lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents and Chemother* **41**, 6, 1322-1325.
30. Smith Moland, E., Hanson, N. D., Herrera, V. L., Black J. A., Lockhart, T. J., Hossain, A., Johnson, J. A., Gering, R. V. & Thomson, K. S. (2003). Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother* **51**, 3, 711–714.
31. Stefanova, M. E., Tomberg, J., Olesky, M., Holtje, J. V., Gutheil, W. G. & Nicholas, R. A. (2003). *Neisseria gonorrhoeae* penicillin-binding protein 3 exhibits exceptionally high carboxypeptidase and β -lactam binding activities. *Biochemistry* **42**, 49, 14614- 14625.
32. Tristram, S. G., Pitout, M. J., Forward, K., Campbell, S., Nichols, S. & Davidson, R. J. (2008). Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing isolates of *Haemophilus parainfluenzae*. *J Antimicrob Chemother* **61**, 3, 509–514.
33. Veras, D. L., Alves, L. C., Brayner, F. A., Guedes, D. R. D., Maciel, M. A. V., Rocha, C. R. C. & Souza Lopes, A. C. (2011). Prevalence of the *bla*_{SHV} gene in *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from hospital and community infections

and from the microbiota of healthy individuals in Recife, Brazil. *Curr Microbiol* **62**, 1610-1616.

34. Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K. & Tenover, F. C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents and Chemother* **45**, 4, 1151–1161.

Table 1. MIC of *K. pneumoniae* isolates obtained in hospital and sub-MICs used for analysis by electron microscopy.

Isolates ESBL pos.	Cefotaxime ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			Ceftazidime ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			Aztreonam ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			Resistance genes
	MIC ^a	sub-MIC ^b		MIC ^a	sub-MIC ^b		MIC ^a	sub-MIC ^b		
		TEM ^c	SEM ^d		TEM ^c	SEM ^d		TEM ^c	SEM ^d	
K3C	>256 [*]	64; 32	32	128 [*]	32; 16	32	64 [*]	32; 16	32	<i>bla</i> _{SHV-11} <i>bla</i> _{TEM-15} <i>bla</i> _{SHV-1} <i>bla</i> _{TEM-1} <i>bla</i> _{CTX-M2}
K16R	>256 [*]	64; 32	32	32 [*]	16; 8	16	16 [*]	4	4	<i>bla</i> _{CTX-M2}
Isolate KPC pos.	Cefotaxime ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			Ceftazidime ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			Imipenem ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			Resistance genes
	MIC ^a	sub-MIC ^b		MIC ^a	sub-MIC ^b		MIC ^a	sub-MIC ^b		
		TEM ^c	SEM ^d		TEM ^c	SEM ^d		TEM ^c	SEM ^d	
K652	≥256	98	98	≥256	27	27	≥128	16	16	<i>bla</i> _{SHV} <i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{KPC-2}

^a MIC: Minimum Inhibitory Concentrations; ^b sub-MIC: sub-Minimum Inhibitory Concentrations; ^c TEM: Transmission Electron Microscopy; ^d SEM: Scanning Electron Microscopy.

Table 2. MIC of *K. pneumoniae* isolates obtained of microbiota and sub-MICs used for analysis by electron microscopy.

Isolates	Ampicillin ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			Amoxicillin ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			Resistance gene
	MIC ^a	sub-MIC ^b		MIC ^a	sub-MIC ^b		
		TEM ^c	SEM ^d		TEM ^c	SEM ^d	
K58.1-F	16	0.5; 2; 8	0.5; 8	32	0.5; 4;16	0.5; 16	NI [*]
K21.1-F	128	0.5; 16; 32; 64	16; 32; 64	>128	0.5; 4; 16; 64; 128	0.5; 16; 128	<i>bla</i> _{TEM}

^a MIC: Minimum Inhibitory Concentrations; ^b sub-MIC: sub-Minimum Inhibitory Concentrations; ^c TEM: Transmission Electron Microscopy; ^d SEM: Scanning Electron Microscopy; * NI: Not Identified the *bla*_{SHV} or *bla*_{TEM} genes.

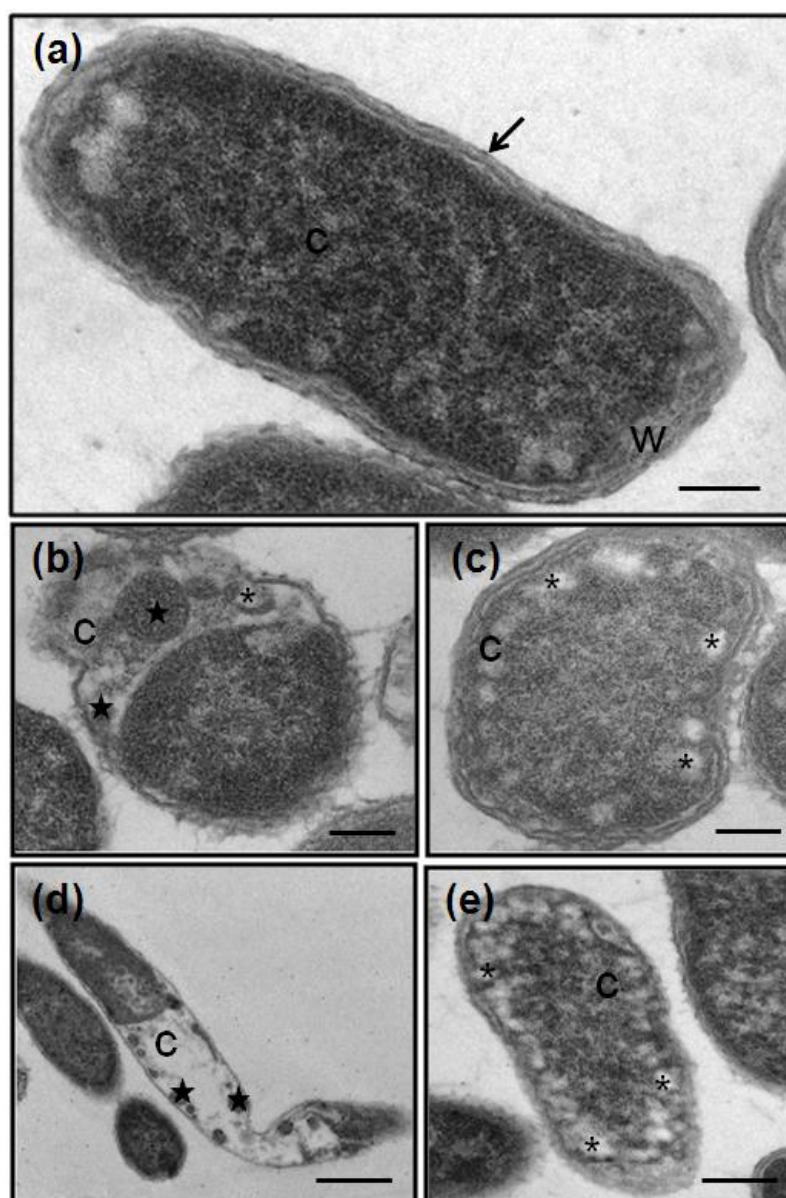


Figure 1 (a-e): Transmission Electron micrographs of isolate K3C from *K. pneumoniae*. **(a):** bacterial cell without treatment (control) - preserved morphology, cytoplasmic membrane (arrow), cell wall (w) and cytoplasm (c) intact. **(b-c):** cells subjected to CTX ($64 \mu\text{g ml}^{-1}$) - decreased cytoplasmic material (c), presence of membrane compartments (stars), electronlucent spaces (asterisks) and disorganization of the membrane and cell wall. **(d):** cell subjected to CAZ ($32 \mu\text{g ml}^{-1}$) - elongated aspect morphology with loss or retraction of cytoplasmic material (c) and the presence of small membrane compartments (stars). **(e):** cell subjected to ATM ($32 \mu\text{g ml}^{-1}$) - normal morphology in the presence of electronlucent spaces (asterisks) in the cytoplasm (c). Bars = $0.5 \mu\text{m}$. CAZ: ceftazidime; CTX: cefotaxime; ATM: aztreonam.

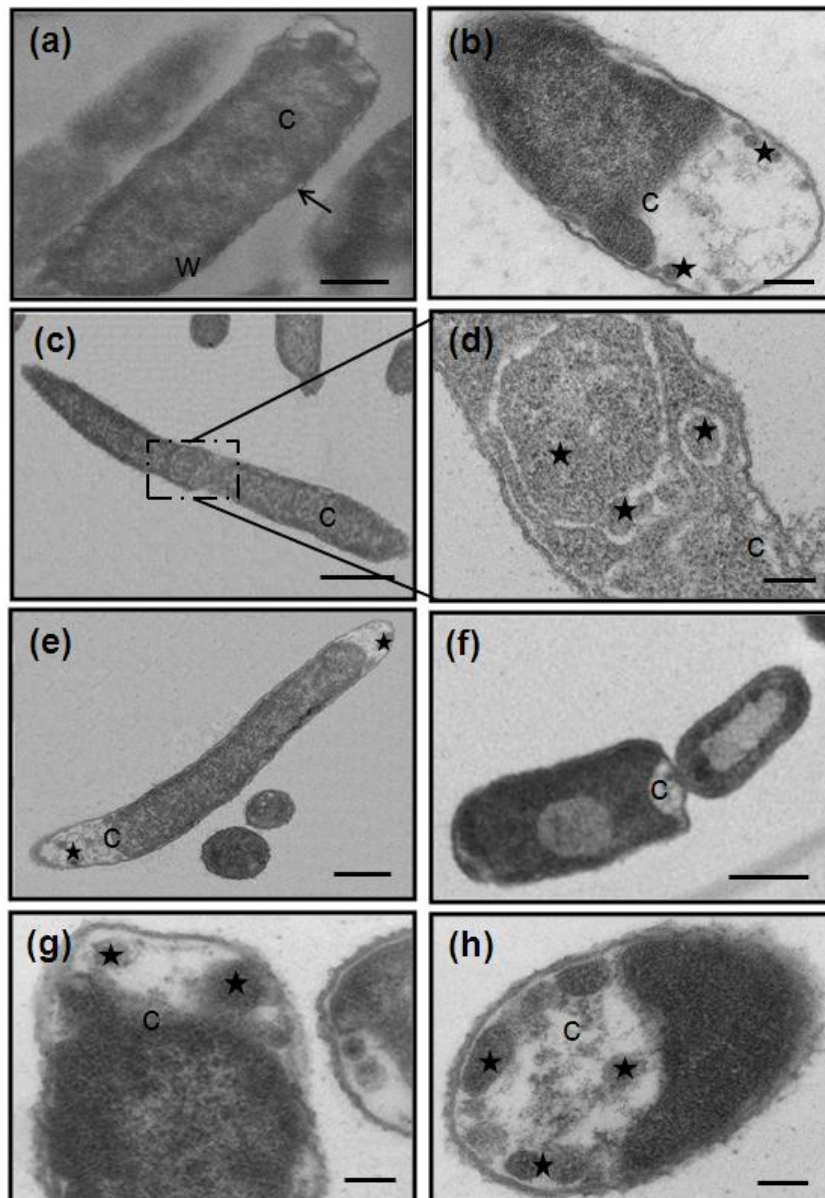


Figure 2 (a-h): Transmission Electron micrographs of isolate K16R from *K. pneumoniae*. (a): untreated bacterial cell - preserved morphology, cytoplasmic membrane (arrow), cell wall (w) and cytoplasm (c) intact. (b): cell subjected to CTX ($64 \mu\text{g ml}^{-1}$) – presence of large electronlucent space due to increased periplasmic space (stars) and reduced cytoplasmic material (c). (c-e): cells subjected to CAZ ($16 \mu\text{g ml}^{-1}$) - (c-d): filamentous cells and the presence of membrane compartments containing cytoplasmic material (star). (e): elongated cell showing loss of cytoplasmic material (star). (f-h): cell subjected to ATM ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$) - loss of cytoplasmic material (c) and presence of membrane compartments (stars). Bars = $0.5 \mu\text{m}$. CAZ: ceftazidime; CTX: cefotaxime; ATM: aztreonam.

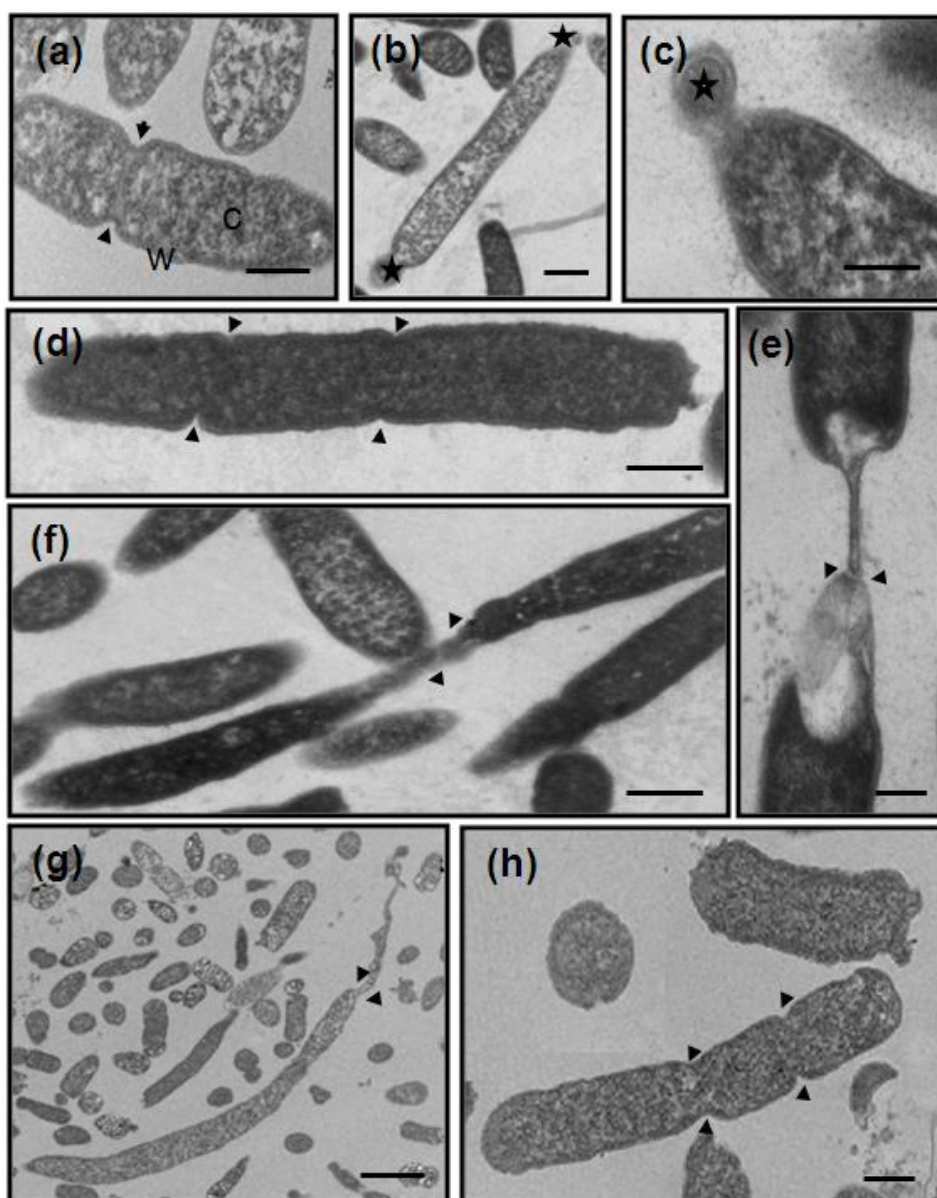


Figure 3 (a-h): Transmission Electron micrographs of isolate K652 of *K. pneumoniae*. **(a):** untreated bacterial cell - cell wall with preserved morphology (w) and cytoplasm (c) intact, besides regular septation (arrowheads). **(b-c):** cell subjected to CTX (98 µg ml⁻¹) - presence of cells not grown and rounded (stars) at the ends of cells with normal morphology. **(d-f):** cells subjected to CAZ (27 µg ml⁻¹) – consecutive formation of septa (arrowheads) providing elongation of bacterial morphology. Observe disorganization of membrane and cell wall with elastic aspect. **(g-h):** cell subjected to IMP (16 µg ml⁻¹) – morphology of elongated appearance with formation of consecutive septa (arrowheads). Bars = 0.5 µm. CAZ: ceftazidime; CTX: cefotaxime; IMP: imipenem.

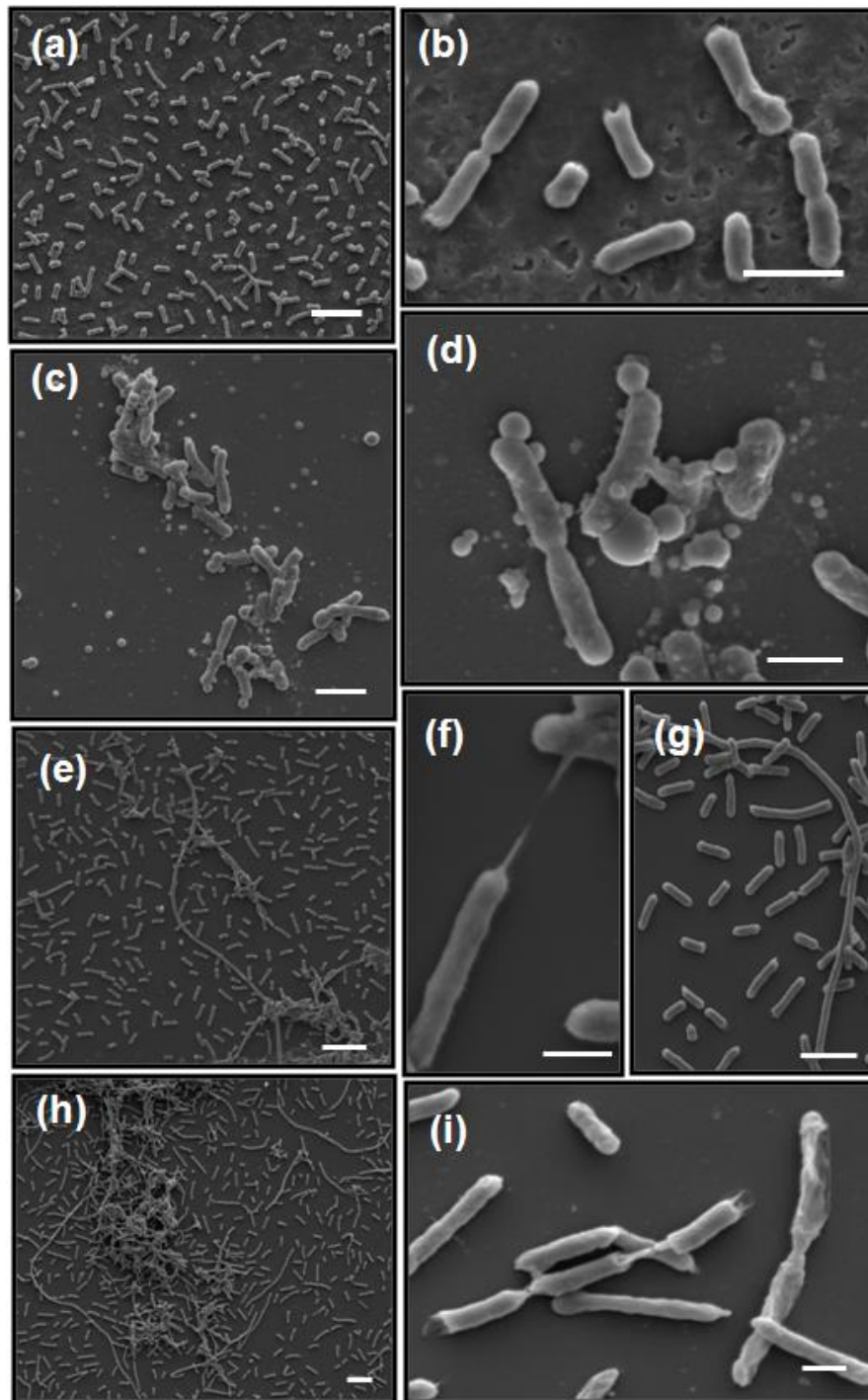


Figure 4 (a-i): Scanning Electron micrographs of isolate K652. **(a-b):** control cells with preserved morphology. **(c-d):** cells subjected to CTX ($98 \mu\text{g ml}^{-1}$). Observe spherical cells not grown being formed from cells with preserved morphology. **(e-g):** cells subjected to CAZ ($27 \mu\text{g ml}^{-1}$). Observe elongated cells forming bacterial filaments. **(h-i):** cells subjected to IMP ($16 \mu\text{g ml}^{-1}$). Observe elongated cells due to unfinished successive divisions. Bars = $2\mu\text{m}$. CAZ: ceftazidime; CTX: cefotaxime; IMP: imipenem.

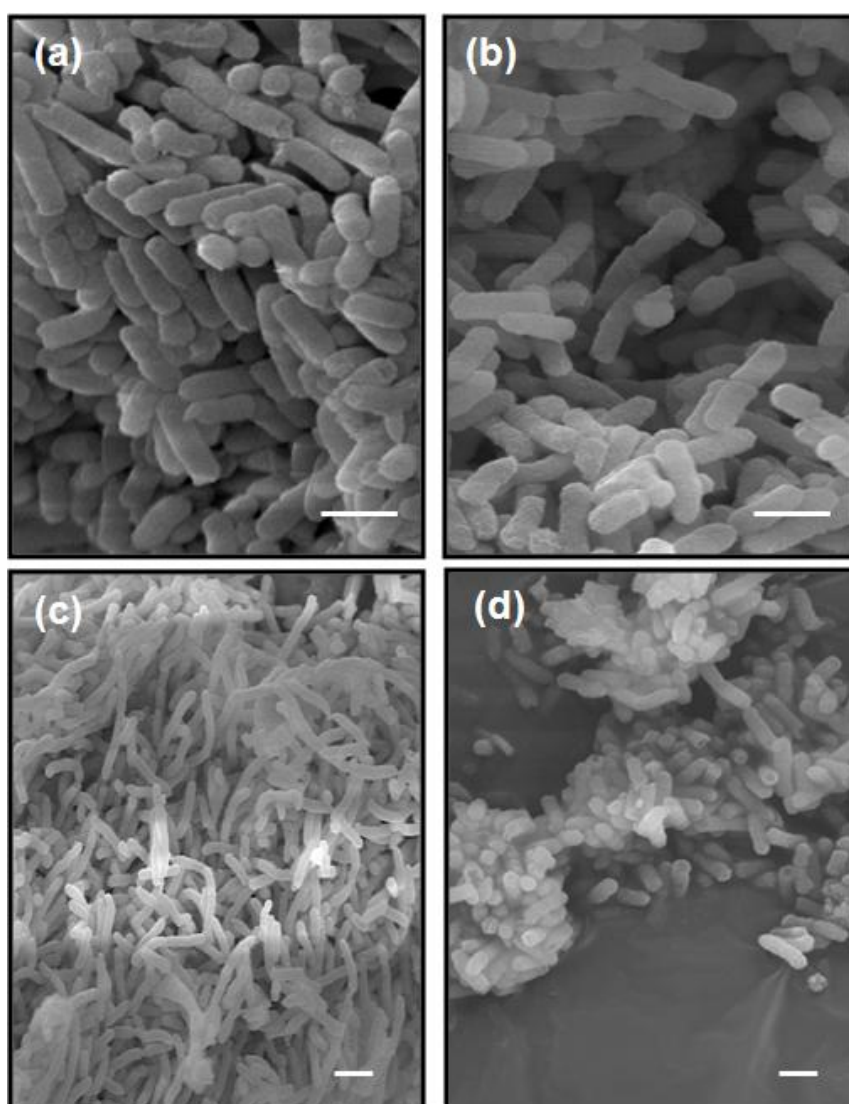


Figure 5 (a-d): Scanning Electron micrographs of Isolate K16R. **(a):** control cells with preserved morphology. **(b):** cells subjected to CTX ($32 \mu\text{g ml}^{-1}$). **(c):** cells subjected to CAZ ($16 \mu\text{g ml}^{-1}$). **(d):** cells subjected to ATM ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$). Bars = $2\mu\text{m}$. CAZ: ceftazidime; CTX: cefotaxime; ATM: aztreonam.

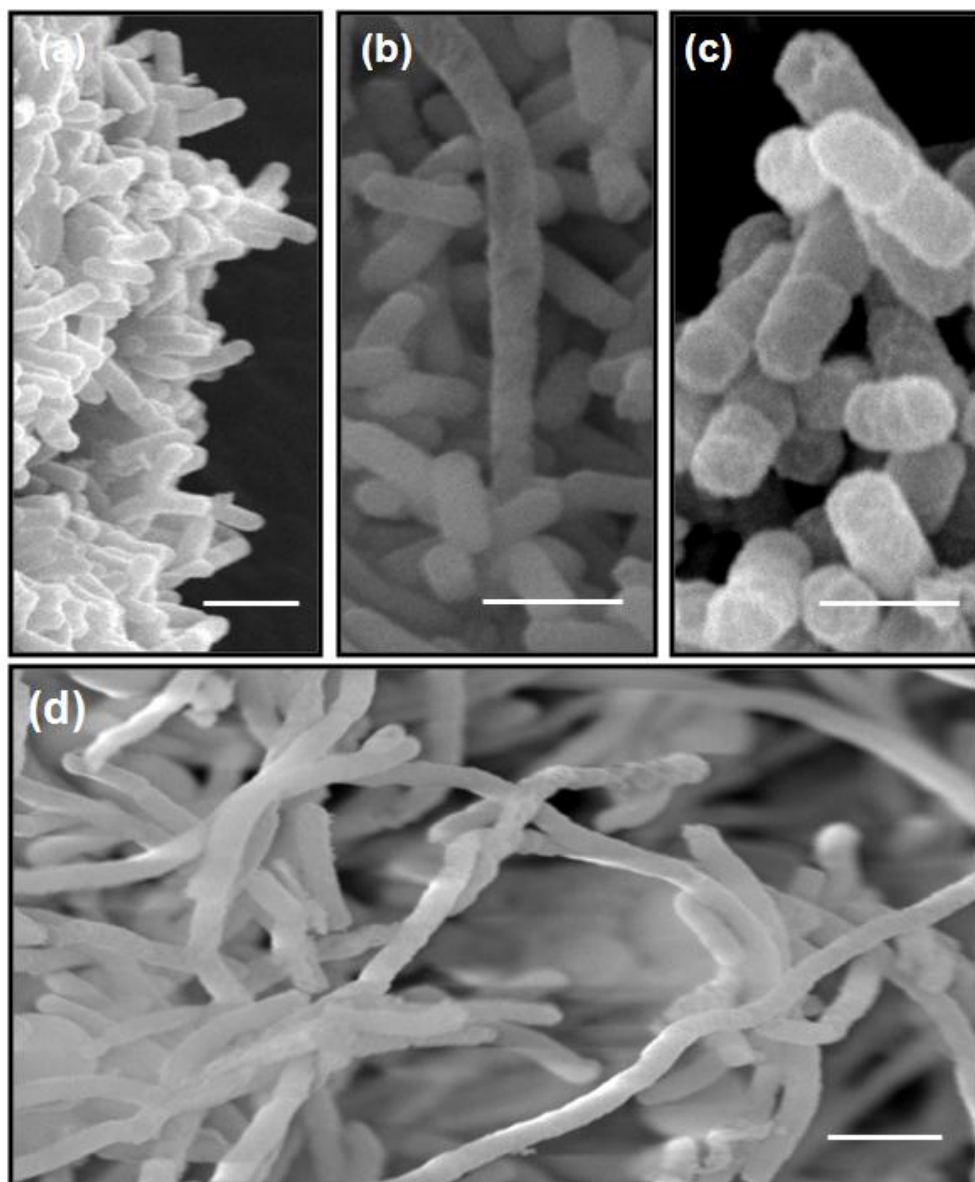


Figure 6 (a-d): Scanning Electron micrographs of Isolate K3C. **(a):** control cells with preserved morphology. **(b):** cells subjected to CTX ($32 \mu\text{g ml}^{-1}$). **(c):** cells subjected to CAZ ($32 \mu\text{g ml}^{-1}$). **(d):** cells subjected to ATM ($32 \mu\text{g ml}^{-1}$). Bars = $2\mu\text{m}$. CAZ: ceftazidime; CTX: cefotaxime; ATM: aztreonam.

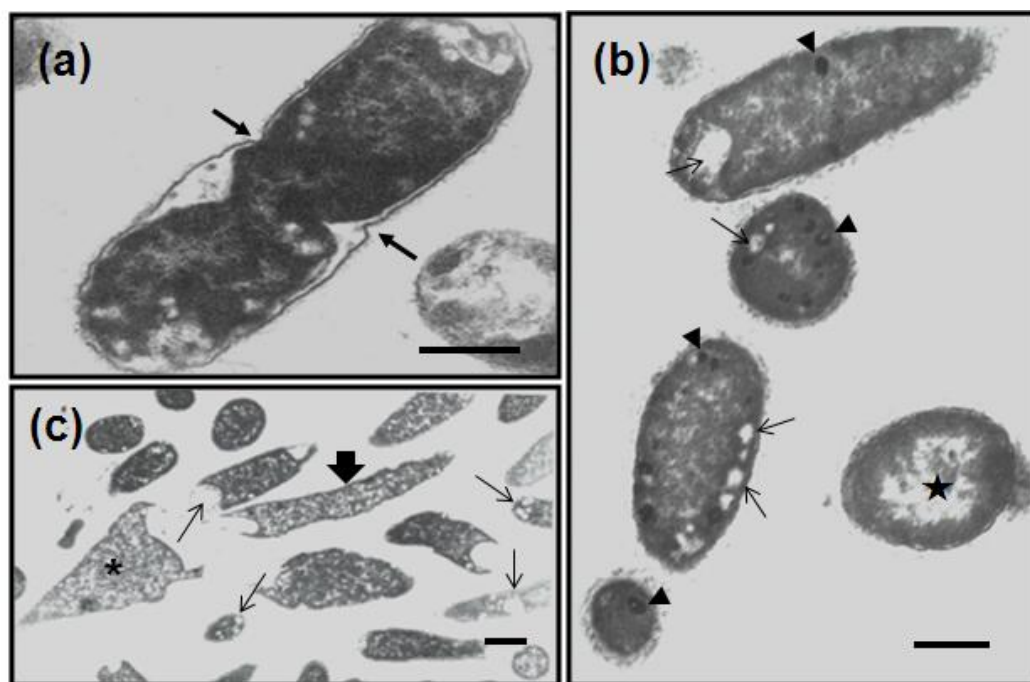


Figure 7 (a-c): Transmission Electron micrographs of isolate K21.1-F and K58.1-F of *K. pneumoniae*. **(a):** isolate K21.1-F submitted to $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin. Observe irregular formation of septa in a dividing cell (arrow). **(b):** isolate K58.1-F subjected to $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ of ampicillin. Cells present electronlucent (fine arrow), and electrondense spaces with different sizes and shape throughout the bacterial cytoplasm (arrowheads), in addition to reduction of cytoplasmic contents (star). **(c):** isolate K58.1-F subjected to $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ of amoxicillin. The cells exhibit altered morphologies with cell elongation (large arrow) and undefined forms (asterisk), with the presence of electronlucent structures with shape and varying sizes scattered throughout the cell cytoplasm (fine arrow). Bars = $0.5 \mu\text{m}$.

APÊNDICE B - Artigo 2: submetido à Revista Microbial Drug Resistance

Inhibition of production of polysaccharide capsule by cephalosporins,
aztreonam and imipenem in *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying the genes
*bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} or *bla*_{KPC}

Dyana Leal Veras ^{a, b, c, e *}

Ana Catarina de Souza Lopes ^c

Ana Paula Sampaio Feitosa ^{a, b, c}

Grasielle Vaz da Silva ^{a, b, d}

Gabriel Gazzoni Araújo Gonçalves ^{a, b}

Marlos de Medeiros Chaves ^f

Catarina Fernandes de Freitas ^{b, c}

Fernanda Cristina Gomes de Lima ^{b, c}

Rafael José Ribeiro Padilha ^a

Luiz Carlos Alves ^{a, b, d}

Fábio André Brayner ^{a, b, c}

^a Setor de Microscopia Eletrônica/Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-Universidade Federal de Pernambuco – LIKA/UFPE – Brasi.

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

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

^d Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Pernambuco/UPE.

^e Departamento de Enfermagem - Faculdade de Ciências Humanas de Olinda – FACHO.

^f Núcleo de Plataformas Tecnológicas – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ CPqAM-Fiocruz – Brasil.

*Correspondence adress:

Dyana Leal Veras

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM-Fiocruz

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

CEP: 50.670-420 Caixa Postal: 7472

Telefone: +55 81 2101-2643/2101-2542. E-mail: dleal@cpqam.ficoruz.br

Abstract

The aim of this study was to determine the influence of β -lactam antibiotics in the production of CPS in five isolates of *K. pneumoniae*, carrying the *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} or *bla*_{KPC} genes. Two clinical isolates and two from community with resistance profile to third generation cephalosporins and aztreonam with different resistance genes for ESBLs underwent clinically relevant concentrations of cefotaxime, ceftazidime and aztreonam. Another clinical isolate with resistance to third-generation cephalosporins and carbapenems, carrier of *bla*_{KPC-2} gene was subjected to clinically relevant concentrations of cefotaxime, ceftazidime and imipenem. The influence of antibiotics on the CPS production in isolates from *K. pneumoniae* was evaluated by TEM. All clinical isolates had confirmed presence of the promoter region of the operon involved in the CPS production. The ceftazidime and aztreonam were able to inhibit the CPS production in isolates from *K. pneumoniae* producing ESBLs but not in the isolate producer of KPC, which had its synthesis strongly inhibited only by imipenem. Cefotaxime did not affect the CPS production none of the isolates analyzed. In this study, ceftazidime, aztreonam and imipenem used at clinically relevant concentrations were able to decrease the CPS production in clinical isolates and community of *K. pneumoniae*, which can contribute to decrease the expression of the most important virulence factor of this bacterial species.

Keywords: *Klebsiella pneumonia*, polysaccharide capsule, β -lactam, ESBL, KPC.

Introduction

Serious infections caused by isolates of *Klebsiella pneumoniae* have become a significant problem worldwide, being associated with high morbidity and mortality rates.^{6, 16}

Penicillins, cephalosporins, and carbapenems are included in the treatment of choice for many infectious diseases, including *K. pneumoniae*, being production of β -lactamases the most common mechanism of resistance to this class of antibiotics in clinically important gram-negative bacteria.⁴

Phenotypic resistance to β -lactam antibiotics in isolates of MDR *K. pneumoniae* is involved with the production of Extended Spectrum β -lactamase (ESBL) mainly in group 2, TEM, SHV and CTX, and more recently the production of KPC.^{13, 20, 21}

The first line of defense for most bacterial pathogens is the elaboration of polysaccharide capsule (CPS), which provides evasion of the host immune system contributing to bacterial pathogenesis. Due to its importance, it would be interesting to develop new substances capable of interfering with the CPS expression.^{8,18}

However, despite the great influence of the CPS in bacterial pathogenesis, there are no studies assessing the impact of clinically important antibiotics, such as β -lactams on the capacity of CPS production in isolates of *K. pneumoniae* MDR carriers with different resistance genes.

The increasing prevalence of antibiotic resistant bacteria foreshadows an impending post-antibiotic period characterized by decreased effectiveness of common antibiotics and routine application of multifaceted approaches, complementary to the treatment of bacterial infections.⁸ Therefore, new strategies

need to be proposed, where old and discarded or even rejected antibiotics, should be investigated and re-used when necessary.⁵

Therefore, this study aimed at identifying by Transmission Electron Microscopy (TEM) the interference of β -lactam antibiotics with the production of CPS in isolates of *K. pneumoniae* obtained from different sources and carriers of *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} ou *bla*_{KPC} genes.

Materials and Methods

Bacterial isolates

This study was performed using five isolates of *K. pneumoniae* obtained in Recife-PE, Brazil (Table 1). The K3C and K16R isolates were obtained from infections related to the health care of the urinary tract from patients admitted to different hospitals. These isolates showed resistance to cefotaxime, ceftazidime and aztreonam, according to CLSI interpretive criteria, 2013.⁷ The isolated K16R has *bla*_{SHV-1}, *bla*_{TEM-1} and *bla*_{CTX-M2} genes and isolate K3C has *bla*_{SHV-11} e *bla*_{TEM-15} genes, previously identified.^{14, 19}

The isolate K652 was obtained by surveillance survey of rectal swabs from individuals without clinical symptoms of bacterial infection, admitted to another public hospital. This isolate has the *bla*_{KPC-2} gene and resistance to cefotaxime, ceftazidime, aztreonam and imipenem, identified in VITEK-2 (Biomérieux) automated system and confirmed by the broth macrodilution test, according to the CLSI recommendations, 2013.⁷

The K3CM and K11CM isolates were obtained from urinary tract infections in

different patients from community. These isolates are resistant to cefotaxime, ceftazidime and aztreonam by the broth macrodilution test, according to the CLSI recommendations, 2013.⁷ The isolate K3CM has *bla*_{SHV-1} and *bla*_{CTX-M2} genes, K11CM has the *bla*_{CTX-M2} gene.^{14, 19}

Amplification and sequencing of the promoter region of the operon related to the CPS production

The genomic DNA of isolates from *K. pneumoniae* was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) according to manufacturer's instructions. Determination of the presence of the gene promoter region for any capsular serotype was performed by PCR in isolates of *K. pneumoniae* using the primers cspc: 5'-TCCCAATTGTGACCGAAATC-3' and cpsprev: 5'-GCTCGCGGCACCAGCTGA-3'.¹¹

After purification of amplicons, using the PureLink PCR Micro Kit (Invitrogen), DNA was sequenced by the method of deoxyribonucleotide chain termination.¹⁷ The analysis of DNA sequences and multiple alignments were performed using DNASTar and BLAST³ softwares.

Determination of CPS production by Transmission Electron Microscopy (TEM)

The CPS production attached to bacterial cell was analyzed in isolates of *K. pneumoniae* with and without submission to third-generation cephalosporins, aztreonam and imipenem (Sigma Aldrich). The strains were grown on Mueller Hinton broth for 18 hours, containing clinically relevant concentrations of different β -lactam

antibiotic in accordance with the phenotypic resistance profiles shown (Table 1).^{1, 2} In all processes was included a control for each isolate under the same conditions without the presence of the antibiotic. Due to polysaccharide composition of bacterial CPS, the identification of the CPS production was performed using the technique of carbohydrates cytochemistry by staining with 0.07% ruthenium red,¹⁰ with modifications.

Briefly, after bacterial growth, cells were washed in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, and centrifuged for further fixation in 0.1 M phosphate buffer, 2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde and 0.07% ruthenium red (Sigma Aldrich). After fixation, cells were post-fixed in 1% and 0.07% osmium tetroxide. Subsequently, cells were washed in 0.1M phosphate buffer and dehydrated using a increasing series of 30 to 100% acetone (Sigma Aldrich). After dehydration the infiltration and material embedment was performed in Epon 812 (Electron Microscopy Science) resin to subsequently obtain ultrathin sections and observation in Transmission Electron Microscope ZEISS EM109.

Only the antibiotics that induced at the same time, the difference in the number of marked cells and the density of aggregated particles electrodense to the cell surface, were considered as inhibiting of CPS production in the isolated tested.

Results

CPS Production

All isolates analyzed have the promoter region of the operon related to CPS production. The sequences of K3C, K16R, K652, and K3CM K11CM isolates were

deposited on the GenBank database under accession numbers KJ411822, KJ411823, KJ411824, KJ411825, KJ411826, respectively. The analysis of control isolates by TEM confirmed the CPS production in all strains tested, demonstrating a staining pattern in which most bacterial cells showed aggregation with a high density of electrodense particles throughout the length of cell surface (Figures 1 (A), 2 (A), 3 (A), 4 (A) and 5 (A)).

Effects of antibiotics on the CPS production

Isolates from community of K. pneumoniae

Isolates of *K. pneumoniae* K3CM and K11CM are resistant to cefotaxime, ceftazidime and aztreonam since for having the *bla*_{CTX-M2} resistance gene. The submission of isolates to cefotaxime and ceftazidime did not induce differentiation in the aggregation pattern of ruthenium red to the bacterial cell surface in any of the isolates. However, aztreonam induced decrease in density of CPS labeling compared to the control cells of both isolates, which may be determined by analysis of fields with the same magnitude, where fewer cells was observed with the cell surface aggregated to electrodense particles. Despite ceftazidime causing no effect on CPS production, it induced morphological change with cell filamentation, due to not terminate cell divisions on multiple cells of the isolates analyzed (Figures 4 and 5).

Clinical isolates of K. pneumoniae

The K3C and K16R isolates showed changes in the pattern of aggregation of

electrodense particles of ruthenium red, indicating decreased CPS production due to submission to ceftazidime and aztreonam, despite having the *bla*_{TEM-15} e *bla*_{CTX-M2}, genes, respectively (Figures 1 and 2). The isolates also showed cellular filamentation due to exposure to ceftazidime with elongation of division septa, often providing the elastic aspect to the division region of bacterial cells. Some cells subjected to aztreonam hasd suffered lysis due to inhibition of the cell wall formation during bacterial division.

The isolate K652 is highly resistant to ceftazidime, cefotaxime, and imipenem for having the *bla*_{KPC-2} gene. The submission of this isolate to ceftazidime, unlike the other clinical isolates, caused no decrease in the amount of ruthenium red marked cells or density of adhered electrodense particles compared to control cells. However, cells also showed cell filamentation (Fig. 3).

The submission of isolate K652 to imipenem, surprisingly, almost completely inhibited the CPS production fixed to the bacterial cells and can be viewed only rare cells with small and few electrodense marks near bacterial cell surface. In addition, cells had cell filamentation with in the division septa due to submission to imipenem.

Similarly to the isolates from community, the submission of clinical isolates of *K. pneumoniae* to cefotaxime did not cause decrease in the CPS production in the isolates analyzed (Figures 1, 2 and 3).

Discussion

The bacterial CPS has great importance in the evasion of the host's immune system, being recently implicated as important target for the development of future broad-spectrum therapeutic compounds intended to replace or supplement the

antimicrobial therapy. CPS removal exposes bacteria to immune clearance pathways often mediated by activation of the complement system, making them less virulent and more sensitive to human serum.⁸ Some studies have reported changes in CPS production in isolates of *K. pneumoniae* and *Escherichia coli* due submission to β -lactam antibiotics, quinolones and aminoglycosides.^{9, 10, 15} In *K. pneumoniae*, the increased CPS production attached to the bacterial cell was found after submission to ciprofloxacin but not ceftazidime.¹⁰ This increase was based on measurements of the diameter of the CPS identified by TEM but not in the density of labeling by ruthenium red. In other studies, however, it has been suggested that the CPS production decreased due to submission of isolates of *Klebsiella oxytoca* and *E. coli* to ciprofloxacin.¹²

In this study, all isolates of *K. pneumoniae* showed the promoter region of the operon related to CPS production and were able to produce it in vitro without submission to β -lactam antibiotics. However, ceftazidime and aztreonam were able to decrease the amount of CPS attached to the cell surface in isolates from *K. pneumoniae* carrying the *bla*_{TEM-15} or *bla*_{CTX-M2} genes and resistant to these antibiotics. The analysis regarding the effect of imipenem on the isolate from *K. pneumoniae* resistant to carbapenems showed strong inhibition of synthesis of CPS attached to the cells, which was surprising given the high resistance of the bacterial isolate and for being the carrier of *bla*_{KPC-2} gene. This inhibition may be related to the interference of imipenem with the bacterial metabolism due to the hostile environment caused by the presence of the antibiotics. This is the first study reporting the interference of imipenem in the CPS production in isolate of *K. pneumoniae* carrier of *bla*_{KPC-2} gene with resistance to carbapenem.

CPS production was also previously investigated in other studies using isolate from *E. coli* subjected to kanamycin and streptomycin, wherein the pre-treatment with aminoglycosides led to an adaptive pattern with increased CPS production, being related to a beneficial response to bacterial cell due to decrease the antibiotic cell permeability.^{9, 15} These studies stress the importance of proper administration of antibiotics during the course of treatment of bacterial infections due to sub-lethal doses of antibiotics to increase the capacity of isolates sensitive to *E. coli* defend themselves from the action of aminoglycosides.

In this study, ceftazidime, aztreonam and imipenem used at clinically relevant concentrations against resistant isolates of *K. pneumoniae* were able to inhibit the CPS production in both clinical isolates and from community, which may contribute to decrease the expression of the most important virulence factor of this bacterial species.

Acknowledgements

We are grateful to the Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde – PDTIS of the Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ and to the Núcleo de Plataformas Tecnológicas of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ, particularly to Dr. Cássia Docena for technical assistance.

Funding

This work was supported by the Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde - PAPES IV (Process number 407826/2012-2) - Fundação Oswaldo

Cruz/FIOCRUZ and Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/FIOCRUZ
(Treasury Funds).

Competing interests

No competing financial interests exist

Ethical approval

Not required.

Table 1. MIC of isolates from *K. pneumoniae* obtained at hospital environment and from infection in community front cefotaxime, ceftazidime, aztreonam and imipenem and sub-MICs used for analysis by TEM.

Isolado ESBL pos	Cefotaxima (mg/L)		Ceftazidima (mg/L)		Aztreonam (mg/L)	
	MIC	sub-MIC	MIC	sub-MIC	MIC	sub-MIC
K3C	>256*	32	128*	32	64*	32
K16R	>256*	32	32*	16	16*	4
K3CM	>256*	32	64*	32	64*	32
K11CM	>256*	32	64*	32	256*	32
Isolado KPC pos.	Cefotaxime (mg/L)		Ceftazidime (mg/L)		Imipenem (mg/L)	
	MIC	sub-MIC	MIC	sub-MIC ^b	MIC	sub-MIC
K652	≥256**	98	≥256**	27	≥128**	16

Abbreviations: MIC: minimum inhibitory concentration, sub-MIC: sub-minimum inhibitory Concentration; *Data obtained in other studies (LOPES et al., 2010; VERAS et al., 2011). ** Unpublished data

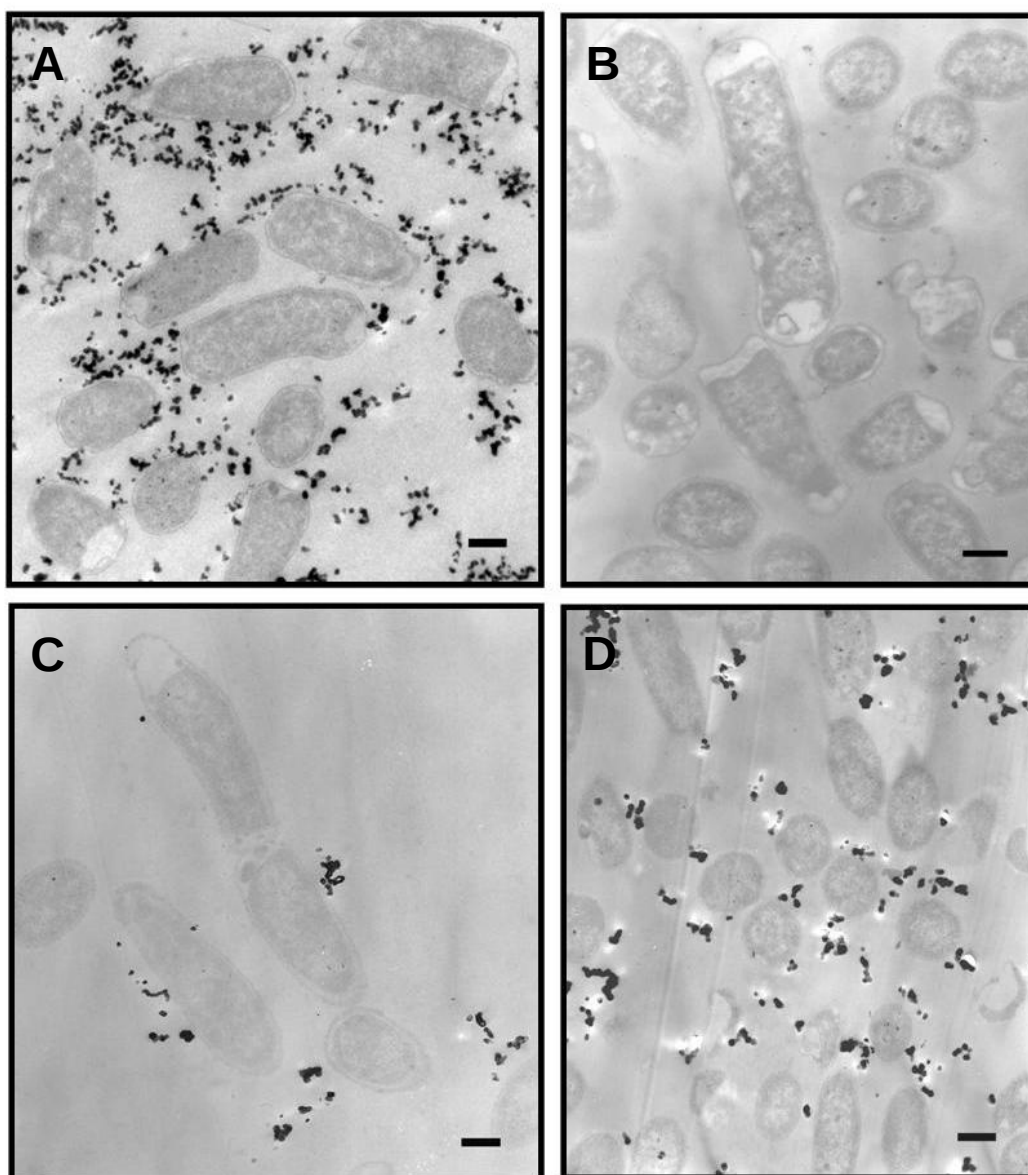


Figure 1 (A-D): Electromicrographs of K3C isolate from *K. pneumoniae* submitted to aztreonam (ATM), ceftazidime (CAZ) and cefotaxime (CTX). **(A):** untreated bacterial cell (control) - preserved morphology with most cells marked by electrodense particles of ruthenium red cells. **(B):** cells subjected to ATM - observe absence of marking of electrodense particles. **(C):** cells subjected to CAZ - cell with filamentous morphology and presence of few electrodense marks around the bacterial cell **(D):** cell subjected to CTX – note most of marked cells in similar density to the control A. Bars: A = 2 μm ; B-D = 1 μm .

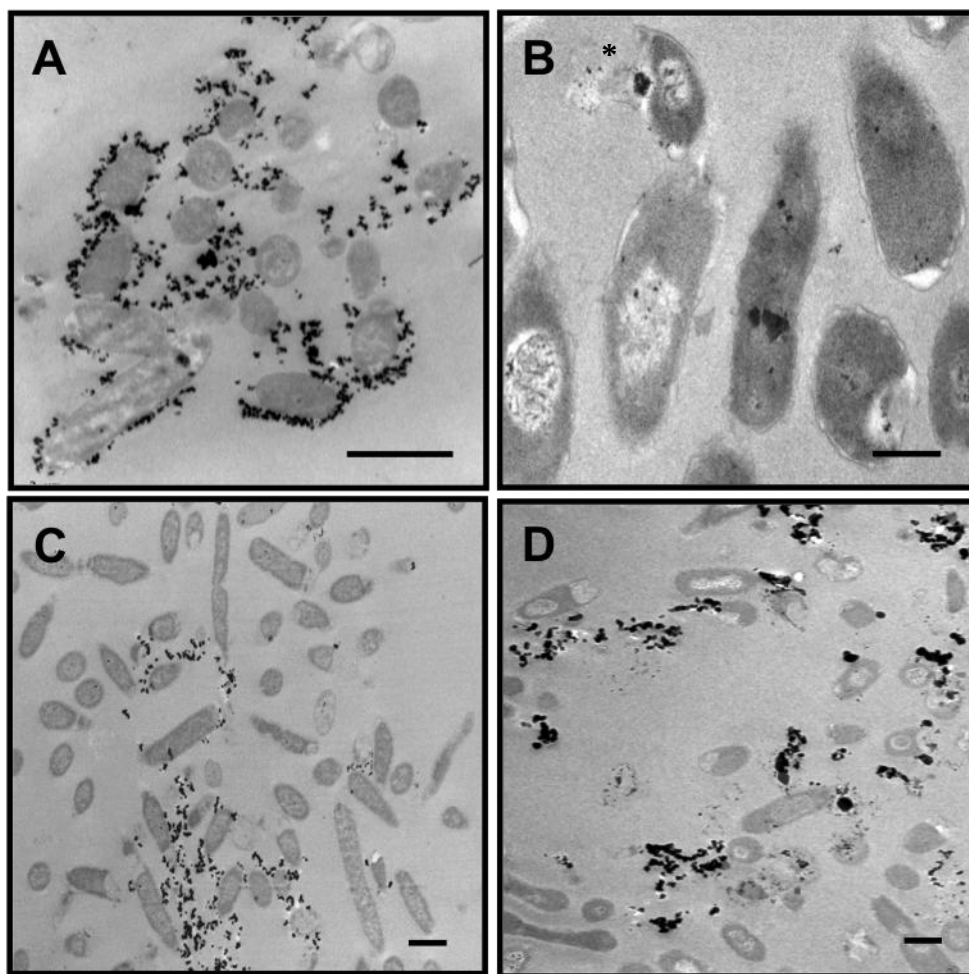


Figure 2 (A-D): Electromicrographs of K16R isolate from *K. pneumoniae* submitted to aztreonam (ATM), ceftazidime (CAZ) and cefotaxime (CTX). **(A):** untreated bacterial cell (control) - preserved morphology with most cells marked by electrodeposited particles of ruthenium red cells. **(B):** cells subjected to ATM - absence of marking of electrodeposited particles and leakage of cytoplasmic material due to disruption of the cytoplasmic membrane (asterisk) **(C):** cells subjected to CAZ - filamentous cells and marking of some bacterial cells by ruthenium red. **(D):** cell subjected to CTX – note most of marked cells in similar density to the control A. Bars: A = 2 μm ; B = 0,5 μm ; C-D = 1 μm

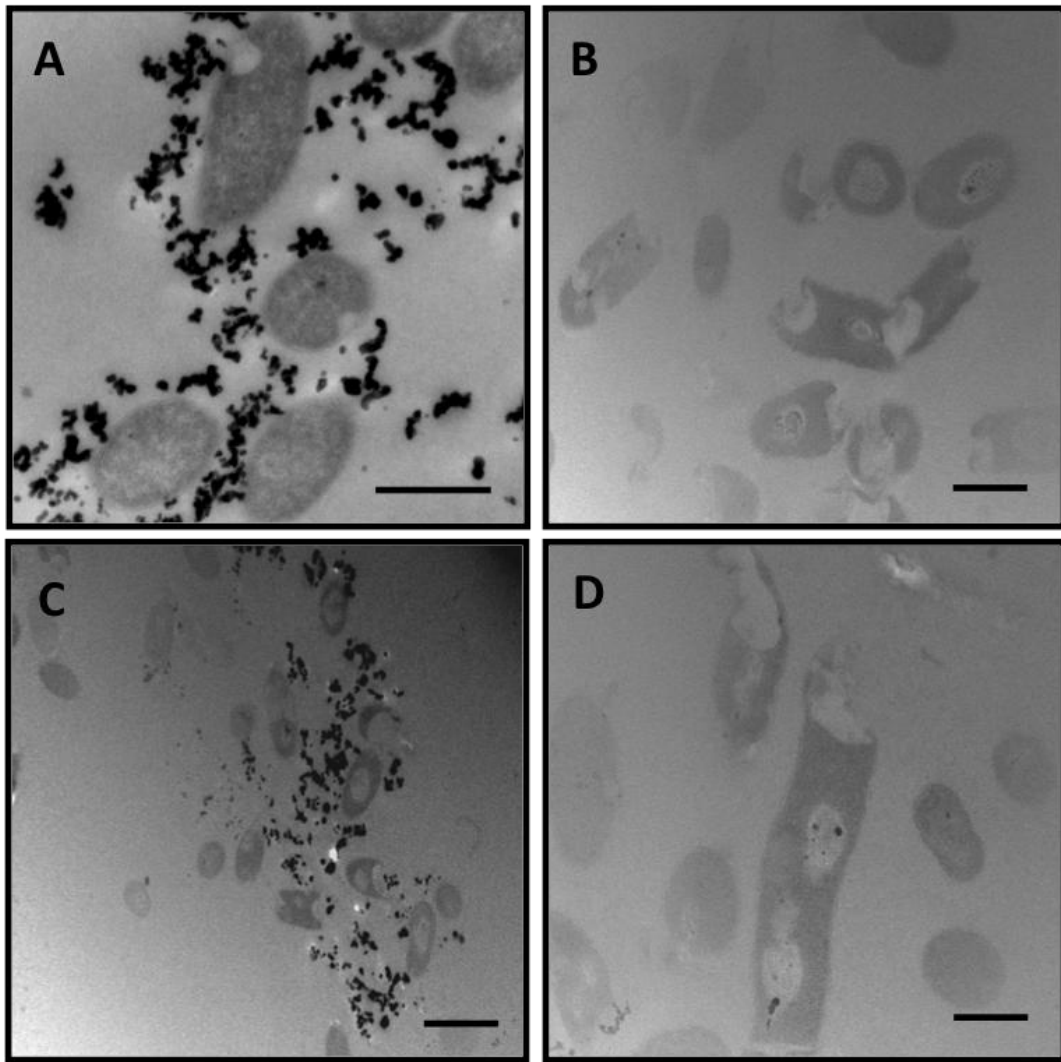


Figure 3 (A-D): Electromicrographs of K652 isolate from *K. pneumoniae* submitted to aztreonam (ATM), ceftazidime (CAZ) and imipenem (IMP). **(A):** untreated bacterial cell (control) - preserved morphology with most cells marked by electron-dense particles of ruthenium red cells. **(B):** cell subjected to CAZ - observe absence of marking of electron-dense particles. **(C):** cell subjected to CTX – note most of marked cells in similar density to the control A. **(D):** cells subjected to IMP - presence of filamentous cells and absence of marking of electron-dense particles from ruthenium red. Bars: A-D = 1 μ m.

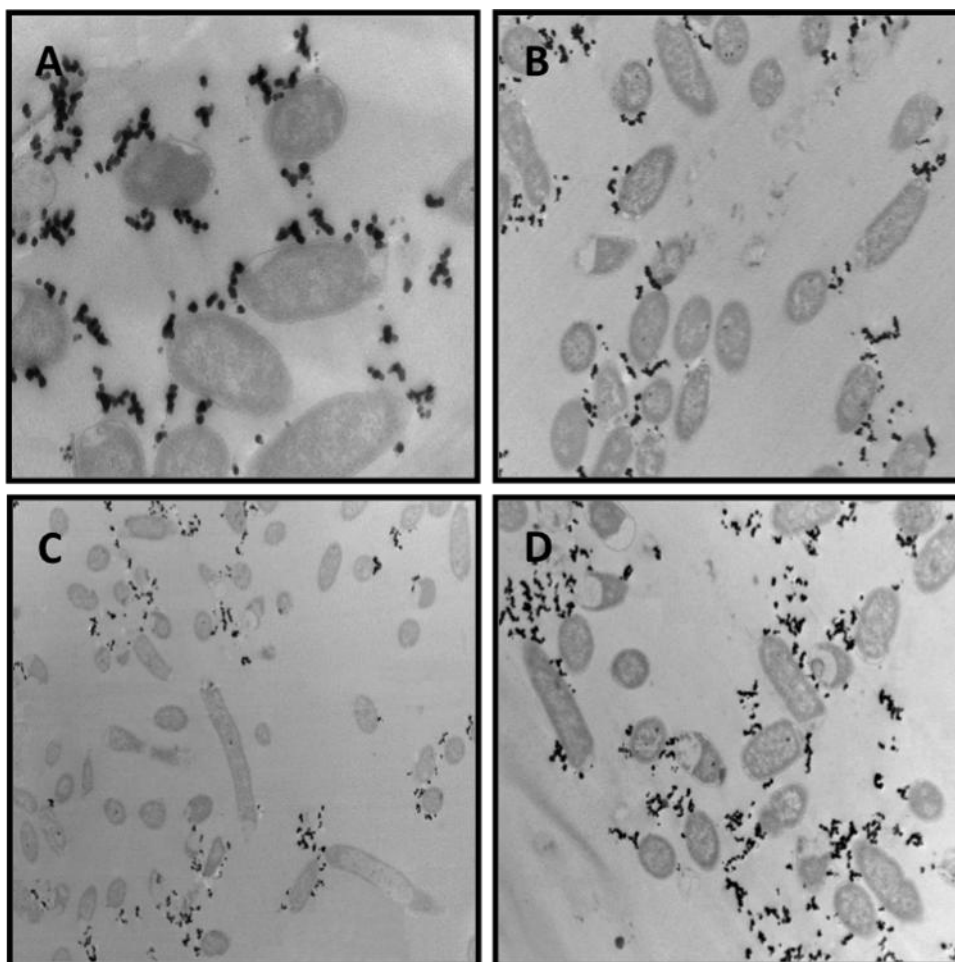


Figure 4 (A-D): Electromicrographs of K11CM isolate from *K. pneumoniae* submitted to aztreonam (ATM), ceftazidime (CAZ) and cefotaxime (CTX). **(A):** untreated bacterial cell (control) - preserved morphology with most cells marked by electron dense particles of ruthenium red cells. **(B):** cells subjected to ATM - observe decrease in density of marks and number of marked cells compared to control. **(C):** cells subjected to CAZ - presence of filamentous cells and marking of bacterial cells by ruthenium red. **(D):** cell subjected to CTX – note most of marked cells in similar density to the control A. Bars A-D = 1 μ m.

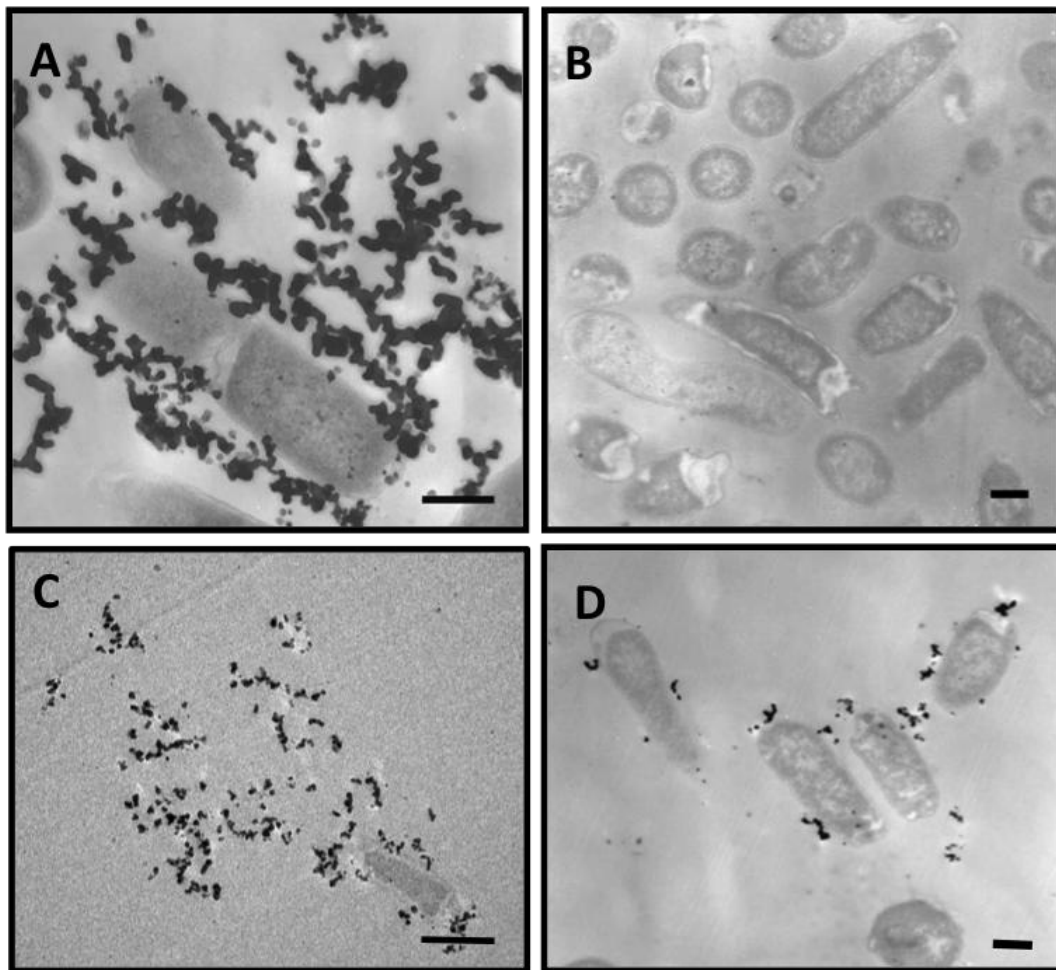


Figure 5 (A-D): Electromicrographs of K3CM isolate from *K. pneumoniae* submitted to aztreonam (ATM), ceftazidime (CAZ) and cefotaxime (CTX). **(A):** untreated bacterial cell (control) - preserved morphology with most cells marked by electron-dense particles of ruthenium red. **(B):** cells subjected to ATM - observe absence of marking of electron-dense particles. **(C - D):** cells subjected to CAZ and CTX, respectively - presence of various cells with marking by ruthenium red in similar density to the control **(A)**. Bars: A - D = 1 μ m.

References

1. Adamis, G., M.G. Papaioannou, E.J. Giamarellos-Bourboulis, P. Gargalianos, J. Kosmidis, and H. Giamarellou. 2004. Pharmacokinetic interactions of ceftazidime, imipenem and aztreonam with amikacin in healthy volunteers. *Int J Antimicrob Agents*. 23:2: 144-149.
2. Ahsman, M.J., E.D. Wildschut, D. Tibboel, and R.A. Mathot. 2010. Pharmacokinetics of cefotaxime and desacetylcefotaxime in infants during extracorporeal membrane oxygenation. *Antimicrob Agents Chemother*. 54:5: 1734-1741.
3. Basic Local Alignment Search Tool [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>].
4. Bush, K., and G.A. Jacoby. 2010. Updated functional classification of β -lactamases.. *Antimicrob Agents Chemother*. 54:3: 969-76.
5. Bush, K., P. Courvalin, G. Dantas, J. Davies, B. Eisenstein, P. Huovinen, G.A. Jacoby, R. Kishony, B.N. Kreiswirth, E. Kutter, S.A. Lerner, S. Levy, K. Lewis, O. Lomovskaya, J.H. Miller, S. Mobashery, L.J. Piddock, S. Projan, C.M. Thomas, A. Tomasz, P.M. Tulkens, T.R. Walsh, J.D. Watson, J. Witkowski, W. Witte, G. Wright, P. Yeh, and H.I Zgurskaya. 2011. Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 9:12: 894-896.
6. Ceccarelli, G., M. Falcone, A. Giordano, M. L. Mezzatesta, C. Caio, S. Stefani, and M. Venditti. 2013. Successful ertapenem-doripenem combination treatment of bacteremic ventilator-associated pneumonia due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 57:6: 2900-2901.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement M100-S15. CLSI, Wayne, PA, USA, 2013.

8. Cress, B.F., J.A. Englaender, W. He, D. Kasper, R.J. Linhardt, and M.A. Koffas. 2013. Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. *FEMS Microbiol Rev.* In press.
9. Ganai S., C. Gaudin, K. Roensch, and M. Tran. 2007. Effects of streptomycin and kanamycin on the production of capsular polysaccharides in *Escherichia coli* B23 cells. *J Exp Microbiol Immunol.* 11: 54-59.
10. Held T.K., C. Adamczik, M. Trautmann, and A.S. Cross. 1995. Effects of MICs and Sub-MICs of antibiotics on production of capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 39: 5: 1093-1096.
11. Hennequin, C., and C. Forestier. 2007. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. *Res Microbiol.* 158: 339-347.
12. Keller N., G. Raponi, I.M. Hoepelman, B.P. Overbeek, M. Rozenberg-Arska, and J. Verhoef. 1991. Effect of sub-minimal inhibitory concentrations of ciprofloxacin and fleroxacin on the bacterial capsular antigen and opsonophagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Zentralbl Bakteriол.* 274:4:519-26.
13. Lin Y.T., F.D. Wang, Y.J. Chan, Y.C. Fu, and C.P. Fung. 2014. Clinical and microbiological characteristics of tigecycline non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in Taiwan. *BMC Infect Dis.* 14:1. In press.
14. Lopes A.C.S., D.L. Veras, A.M.S. Lima, R.C.A. Melo, and J. Ayala. 2010. *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 105: 2:163-167.
15. Lu E., T. Trinh, T. Tsang, and J. Yeung. 2008. Effect of growth in sublethal levels of kanamycin and streptomycin on capsular polysaccharide production and

- antibiotic resistance in *Escherichia coli* B23. J Experiment Microbiol Immunol. 12:21-26.
16. Mammina, C., C. Bonura, A. Aleo, T. Fasciana, T. Brunelli, G. Pesavento, R. Degl'Innocenti, and A. Nastasi. 2012. Sequence type 101 (ST101) as the predominant carbapenem-non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* clone in an acute general hospital in Italy. Letters to the Editor. Int J Antimicrob Agents. 39:6: 539-547.
17. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1992. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Biotechnology. 24: 104-108.
18. Schembri, M.A., J. Blom, K.A. Krogfelt, and P. Klemm. 2005. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. Infect and Immun. 73:8: 4626-4633.
19. Veras, D.L., L.C. Alves, F.A.S. Brayner, D.R.D. Guedes, M.A.V. Maciel, C.R.C. Rocha, and A.C.S. Lopes. 2011. Prevalence of the *bla*_{SHV} gene in *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from hospital and community infections and from the microbiota of healthy individuals in Recife, Brazil. Curr Microbiol. 62:5: 1610-1616.
20. Wallace, K.M.P., K.M. Papp-Wallace, C.R. Bethel, A.M. Distler, C. Kasuboski, M. Taracila, and R.A. Bonomo. 2010. Inhibitor resistance in the KPC-2 β -lactamase, a preeminent property of this class A β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 54:2: 890–897.
21. Wang G., T. Huang, P.K. Surendraiah, K. Wang, R. Komal, J. Zhuge, C.R. Chern, A.A. Kryszuk, C. King, and G.P. Wormser. 2013. CTX-M β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in suburban New York City, New York, USA. Emerg Infect Dis. 19:11:1803-10.

ANEXO A – Comprovante de submissão à Revista Microbiology

6/2/2014

mic/2014/078022 - Confirmation

[Dr Dyana Veras \(Author\)](#) [Queue Summary](#) [Reviewer Area](#)

Manuscript Submission

mic/2014/078022 - Version 1

Submission progress:

[Submission Guide](#)

[Manuscript
Metadata](#)

[Abstract, Cover
Letter and
Responses](#)

[Suggested and
Excluded Editors
and Reviewers](#)

[Authors](#)

[Manuscript
Specifics](#)

[Manuscript Files](#)

[Submission
Proofing](#)

Submission Confirmation

Your submission is now complete. Thank you for submitting your work to Microbiology. Your manuscript has been given the following ID. Please make a note of this ID and use it to refer to your manuscript in any communications:

mic/2014/078022

You may check on the status of your submission at any time by visiting your [author area](#). You can direct any other inquiries regarding this submission to submit.mic@sgm.ac.uk.

Online Submission Feedback

[\[Send us your comments\]](#)

Microbiology Information for Authors

Last updated 30 November 2012

Information that has changed substantially since the previous version is highlighted

[Click here for the XHTML version of this information](#)

Table of Contents

1. Scope and Editorial Policy.....	3	2.4.2 Summary (Abstract)	9
1.1 Scope	3	2.4.3 Introduction	10
1.1.1 General	3	2.4.4 Methods.....	10
1.1.2 Types of paper.....	3	2.4.5 Results.....	10
1.2 Editorial Policy	4	2.4.6 Discussion	10
1.2.1 Use of data from ongoing sequencing projects	4	2.4.7 Acknowledgements.....	10
1.2.2 Papers reporting microarray and other genome-wide studies	4	2.4.8 References.....	10
1.2.3 Papers reporting original nucleotide or amino acid sequence data	5	2.4.9 Tables	11
1.2.4 Papers reporting MLST analyses	5	2.4.10 Figures.....	11
1.2.5 Papers reporting new insertion sequences	5	2.4.11 Colour figures.....	12
1.2.6 Papers describing mathematical models	5	2.4.12 Supplementary material	12
1.2.7 Papers describing solely the purification and/or characterization of enzymes	5	3. Style, Nomenclature and Units.....	12
1.2.8 Papers on host–microbe interactions.....	5	3.1 Nomenclature of micro-organisms.....	12
1.2.9 Descriptions of novel taxa.....	6	3.1.1 Vernacular names	12
1.3 Submission and publication requirements	6	3.2 Chemical and biochemical nomenclature	13
1.3.1 Paper length	6	3.3 Enzyme nomenclature.....	13
1.3.2 Originality, authorship and copyright	6	3.4 Genetic nomenclature.....	13
1.3.3 Ethics of experimentation.....	6	3.5 Abbreviations	13
1.3.4 Research integrity	7	3.6 Units.....	13
1.3.5 Policy on security and censorship.....	7	3.6.1 General points	13
1.3.6 Author self-archiving	7	3.6.2 Molecular mass	14
1.3.7 Open access and PubMed Central deposition.....	7	3.6.3 Absorbance, optical density and attenuation.....	14
2. Preparing and Submitting a Paper	8	3.7 Presentation of nucleotide and amino acid sequences	14
2.1 General information	8	4. Peer Review and Publication	14
2.2 Pre-submission checklist	8	4.1 Editorial handling of papers	14
2.3 Preparing files for submission.....	8	4.2 Submitting a revised manuscript	14
2.4 General style and layout	9	4.3 Source files for publication.....	15
2.4.1 Title page	9	4.3.1 Text.....	15
		4.3.2 Tables	15
		4.3.3 Equations	15
		4.3.4 Line figures	15

4.3.5 Halftone figures (photographs).....	15
4.3.6 Scanning images	15
4.3.7 Supplementary material	15
4.4 Publication ahead of print	16
4.5 Proof corrections	16
4.6 Reprints	16
4.7 Cover illustrations.....	16

1. Scope and Editorial Policy

Queries or comments about online submission should be sent via the email links from the submission site. General enquiries should be sent to the Editorial Office:

Microbiology Editorial Office, SGM, Marlborough House, Basingstoke Road, Spencers Wood, Reading RG7 1AG, UK.
Tel: +44 118 988 1804. Fax: +44 118 988 1834.
email: micro@sgm.ac.uk

1.1 Scope

1.1.1 General

Microbiology publishes high-quality research papers and reviews on all aspects of microbiology, with a strong emphasis on fundamental studies on the biology of prokaryotic and eukaryotic micro-organisms; papers elucidating molecular mechanisms are particularly welcome. Papers published must make an original and significant contribution to the field and should be of interest to a general readership. Theoretical and predictive papers are considered for publication provided that significant and novel conclusions are drawn or hypotheses formulated. Papers that are methodological can be accepted but they must provide a significant biological insight into the microbiology of the organism being studied. Papers that are preliminary, derivative or merely descriptive, or those that are technically competent but do not make a significant advance in the biology of microbes, are not appropriate for *Microbiology* and may be rejected without review. Papers that are largely clinical or epidemiological and that do not offer significant insight into the biology of the organism may be more appropriate for a clinical journal such as *Journal of Medical Microbiology*. Papers on viruses of bacteria and eukaryotic microbes will be considered, but not those on viruses of higher organisms. Authors submitting papers on viruses should explain in a covering letter why their paper is more appropriate for *Microbiology* than for a virology journal such as *Journal of General Virology*.

Papers should be written concisely, in English, and contain only figures and tables that are essential for conveying the results. Short communications as such are not published, but there is in principle no lower limit on the length of papers, provided that they are of an appropriate scientific standard. Research papers should normally contain no more than approximately 6000 words, and up to eight figures and tables combined. Please note that authors may be required by the handling editor to reduce the length of longer papers where the excess

length has no scientific justification. The guidelines for Review papers are given below.

1.1.2 Types of paper

Research papers are published under the subject headings shown below. Examples of topics covered by these headings are indicated. Clearly not every topic can be listed; as noted above, the journal welcomes papers on all aspects of microbiology, from the molecular to the systems level.

- Cell and Molecular Biology of Microbes (*gene expression and regulation, signalling and communication, stress responses, secretion, differentiation and development, cell cycles, ultrastructure*)
- Environmental and Evolutionary Microbiology (*microbial ecology, non-pathogenic plant-microbe interactions, population genetics, community structures and interactions, biodegradation and bioremediation, biodiversity and evolution*)
- Genes and Genomes (*systems biology, genomics and proteomics, metagenomics, synthetic microbiology, bioinformatics, gene transfer, chromosomes and extrachromosomal DNA, genome announcements*)
- Microbial Pathogenicity (*mechanisms of human, animal and plant pathogenesis, virulence and virulence factors, cellular microbiology, infections and immunity, antibiotic-resistance mechanisms*)
- Physiology and Biochemistry (*metabolic pathways and their regulation, bioenergetics and transport, synthesis of macromolecules, metabolomics*)

Authors should indicate the appropriate heading for their paper on the title page and in the Contents Category field of the online submission form.

See [below](#) for the editorial policy on some specific types of research paper.

Reviews. *Microbiology* publishes invited reviews and also welcomes enquiries from authors considering submitting review manuscripts. For advice about the suitability of a potential review for *Microbiology*, authors should contact the Reviews Editor via the Editorial Office. Reviews are subject to the normal peer evaluation process, and the Reviews Editor may request changes or decide not to proceed with publication. All Reviews are available with immediate open access as soon as they are published. All reviews must be submitted online and authors should consult this Information for Authors and recent issues of the journal for general guidance on presentation and scope. The

text should be divided into subsections with appropriate (un-numbered) headings. All review articles must include a summary of not more than 250 words. *Microbiology* attracts a wide range of readers who will not necessarily be specialists in the field of the review article. Authors should therefore provide a brief background to place their review in the broader context of microbiology as a whole. The text should not give undue emphasis to the work of the author(s) and should present controversial areas of the topic in a clear and objective way. However, authors need not refrain from being critical or from concentrating on areas in which their personal research interests lie. References to unpublished work should be avoided as far as possible and should never be used to underpin key points of the review.

Reviews should normally be between 3500 and 8000 words (excluding the abstract and references but including figure and table legends), with up to eight display items (figures and tables). As for all articles published in *Microbiology*, there is no charge for the use of colour in figures, if the use of colour is judged by the Reviews Editor to be necessary for scientific reasons. Shorter reviews (up to 3500 words, formerly called mini-reviews) should focus on a clearly defined topic of current interest and describe recent developments in the field. Longer reviews (up to 8000 words) are appropriate for authors wishing to provide a more in-depth view of a broadly defined topic. Reviews longer than 8000 words may be acceptable, at the discretion of the Reviews Editor and if there is clear justification. There is no limit on the number of references; authors are encouraged to cite the relevant literature comprehensively, but to use their discretion to avoid an excessively long bibliography.

Microbiology Comment. This item provides a forum for discussion of scientific issues arising directly from papers published in *Microbiology*. The authors of papers under discussion will be offered an opportunity to respond. Contributions to *Microbiology* Comment should be brief and to the point. A single small table or figure may be included, as may a limited number of references. A short title (fewer than 50 characters) should be provided. Approval for publication rests with the Editor-in-Chief, who reserves the right to edit articles. When submitting a Comment article, select 'Comment' in the Contents Category field of the online submission form.

Meeting Reports. Submission of short reports of recent meetings of interest to microbiologists is welcomed. The decision whether to publish these is made by the Editor-in-Chief; please contact the Editor-in-Chief via the Editorial Office (micro@sgm.ac.uk) before submitting a Meeting Report to determine suitability. Meeting Reports should give a brief account of highlights from the

meeting, and include some comment on their significance. They should not attempt to cover every contribution. All the contributors whose work is mentioned in the report must be named. Meeting Reports should not exceed 2500 words. They must be submitted no more than 1 month after the date of the meeting, and will be given priority for publication. Before submitting the Meeting Report, the author(s) of the report must obtain permission from both the meeting organizer and any participants whose work is mentioned (and if appropriate the meeting sponsor) to report results presented at the meeting. Confirmation of this will be required before publication.

1.2 Editorial Policy

1.2.1 Use of data from ongoing sequencing projects

Authors making use of data from ongoing sequencing projects must follow the guidelines set by the project and give appropriate acknowledgement of the data source. Authors should show evidence that they have discussed their findings with the scientists responsible for the sequencing programme whose data are being used and that the organization has approved what is being submitted.

1.2.2 Papers reporting microarray and other genome-wide studies

Microbiology encourages the publication of papers that use genome-wide approaches to answer important questions in microbiology. However, papers that report the results of such studies without using them to increase our understanding of a system, process or organism are unlikely to be acceptable to the Editors. Papers reporting genome-wide studies must contain sufficient details for readers to understand how the data were acquired, to be able to repeat the analysis, and to place the results in the context of the field. There must be enough replicates to make the data biologically meaningful, and the relevant strain(s) must be made available by the authors to bona fide researchers on request at reasonable cost for non-commercial purposes, or be deposited in a public culture collection.

Data from microarray gene expression studies must comply with the MIAME guidelines, and relevant criteria from the MIAME checklist should be applied to other genome-wide studies.

Authors who submit papers whose conclusions explicitly or implicitly depend on genome-wide profiling should preferably deposit the relevant

complete data sets in a public online database such as GEO before submission, with password protection if appropriate (see [NCBI](#) for guidance), and provide the accession number/password with their submitted paper. The supplementary data files should also include details of organisms, growth conditions, etc. ('metadata'), if these are not given in the paper. If the data sets are not already in a public database at the time of submission, they must be submitted to *Microbiology* as one or more supplementary files for peer review along with the paper. If the paper is acceptable for publication, it will be a condition of acceptance that the genomics data be posted to a public database if this has not already been done, and that an accession number be provided on the title page of the paper.

1.2.3 Papers reporting original nucleotide or amino acid sequence data

Microbiology will not normally publish DNA sequences from double-stranded genomes unless both strands have been sequenced independently. Descriptions of new examples of genes already characterized from various micro-organisms are inappropriate for *Microbiology* unless the new gene has unusual features or the description is part of a wider study. Such papers should be accompanied by substantial additional experimentation to characterize the gene(s) and products(s) concerned, and/or substantial computer analysis leading to important, novel conclusions.

Papers reporting new sequence data must include an accession number from one of the public databases (GenBank, EMBL, DDBJ or PIR) and the relevant deposition criteria for the database must be adhered to.

1.2.4 Papers reporting MLST analyses

For papers that report MLST analyses, the MLST gene sequence data for all samples presented in the paper must be available to the reader. If there is an established database for the studied organism (e.g. on [mlst.net](#) or [pubmlst.org](#)) then data should be submitted there and details should be provided on submission. Otherwise, data must be submitted for review along with the main paper as a single supplementary file.

1.2.5 Papers reporting new insertion sequences

Authors of papers describing new insertion sequences (whether alone or as part of larger sequencing projects) should deposit the relevant information with the [ISfinder Database](#) using the online forms provided, and obtain an attribution

number. The attribution number should be given on the title page of the manuscript.

1.2.6 Papers describing mathematical models

Authors of papers that include descriptions of mathematical models will normally be expected to provide appropriate details of the model with their submission so these are available to the reviewers. If appropriate, authors may also supply details of the model to the [JWS Online database](#) for validation by the reviewers; see the website for full details. *Microbiology's* Editorial Consultant for mathematical modelling, Dr Jacky L. Snoep, Stellenbosch University, South Africa, may be consulted during the review of such papers. Authors should submit their paper in the normal way and wait until they have received an acknowledgement and paper number from the Editorial Office before submitting a description of the model as an ASCII text file to JWS Online. Only the authors, reviewers and Dr Snoep will be able to gain access to the online model during the review stage, via passwords. If the paper is accepted for publication, the model can, with the authors' permission, be made available to all, so readers of the paper will be able to adjust model parameters and run the model over the internet.

1.2.7 Papers describing solely the purification and/or characterization of enzymes

It is editorial policy not to publish papers on the above subject(s) unless they describe some particular aspect that is of significant novelty and of clear relevance to microbiology, e.g. the purification of a previously uncharacterized enzyme; a description of unique properties of an established class of enzyme; the development of a new and broadly applicable purification technique; or a report of properties of direct relevance to the functions or application of the producing micro-organism. Descriptions of well-known enzymes that are already known to be produced by a number of micro-organisms are not appropriate for *Microbiology*.

1.2.8 Papers on host-microbe interactions

Papers submitted to *Microbiology* that concern host-microbe interactions, including infectious, symbiotic or probiotic interactions, must increase our understanding of the micro-organism concerned. Papers detailing the host response with minimal reference to the micro-organism or its products do not fall within the scope of *Microbiology*.

1.2.9 Descriptions of novel taxa

Microbiology does not normally publish papers whose primary purpose is to describe one or more novel species of micro-organism. Authors must state in a covering letter why such papers are not more appropriate for a specialized systematics journal such as the [International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology](#). Such papers may be suitable for consideration by *Microbiology* when they form part of a wider study addressing some aspect of ecology, evolution or physiology. Papers reporting novel taxa must include a formal description complying with the appropriate Code of Nomenclature, and should designate the type strain, which must be held in two or more publicly accessible culture collections in different countries. For bacteria, the authors must notify the [International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology](#) of the publication of the description so that the name can be validly published by inclusion in a Validation List.

1.3 Submission and publication requirements

1.3.1 Paper length

Papers should be written concisely and contain only figures and tables that are essential for conveying the results. As a guide, research papers published in *Microbiology* should normally contain no more than approximately 6000 words (including the figure and table legends, in-text citations and any appendices, but not including the abstract, acknowledgements or reference list) and up to eight figures and tables combined. Please note that authors may be required by the handling editor to reduce the length of longer papers where the excess length has no scientific justification. Short communications as such are not published, but there is in principle no lower limit on the length of papers, provided that they are of an appropriate scientific standard.

Reviews should normally be between 3500 and 8000 words (excluding the abstract and references but including figure and table legends), with up to eight figures and tables. Shorter reviews (up to 3500 words, formerly called mini-reviews) should focus on a clearly defined topic of current interest and describe recent developments in the field. Longer reviews (up to 8000 words) are appropriate for authors wishing to provide a more in-depth view of a broadly defined topic. Full details are available in the Reviews section above.

Colour figures are published free of charge if the use of colour is judged to be necessary for scientific

reasons, and no charges are levied on online-only supplementary material.

1.3.2 Originality, authorship and copyright

Papers submitted must report work that has not been published previously and is not under consideration for publication elsewhere. Papers submitted to *Microbiology* that have been published preliminarily online (e.g. in Nature Precedings, Faculty of 1000 posters or PLoS Currents) will only be considered if there is a significant amount of additional novel data and analysis to warrant publication. *Microbiology* considers preliminary online publication as prior publication, and reviewers and Editors must be able to clearly identify how the paper differs from the preliminary report and that substantially more work is incorporated into the manuscript.

All the authors must have agreed to the submission, and to the order of their names on the title page. They must also have agreed that the corresponding author may act on their behalf throughout the editorial review and publication process. The corresponding author is responsible for obtaining such agreement. Requests for changes in authorship after submission must be accompanied by signed agreements from all the parties involved.

If the paper is accepted for publication in *Microbiology*, the authors (or other copyright holder) should transfer to the Society for General Microbiology (SGM) the copyright (including electronic reproduction rights) of the paper where it exists, which will then not be published elsewhere in the same form, in any language or medium, without the consent of the Society. Click [here](#) to download a Copyright Transfer Agreement form/Licence to Publish.

1.3.3 Ethics of experimentation

Papers describing any experimental work with humans should 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 should be done in accordance with the legal requirements of the relevant local or national authority. Procedures should be such that experimental animals do not suffer unnecessarily. Papers should include details of the procedures and of anaesthetics used. The Editors will not accept papers where the ethical aspects are, in their opinion, open to doubt. Authors may wish to consult the ARRIVE guidelines for reporting *in vivo* experiments [Kilkenny *et al.* (2010). *PLoS Biol* 8(6), e1000412 [doi:10.1371/journal.pbio.1000412](#)].

1.3.4 Research integrity

SGM is a member of the [Committee on Publication Ethics](#) (COPE) and its editors operate within the COPE Code of Conduct for Journal Editors. Complaints of unethical behaviour will be investigated by SGM in line with [COPE's flowcharts](#) for such investigation. Common reasons for such investigation include:

- **Redundant (duplicate) publication.** Publication of an already published article, or a substantial portion of a published article, including unauthorized publication in translation.
- **Plagiarism.** Plagiarism is the unauthorized and/or uncredited reuse of content or ideas generated by another person. Plagiarism can occur without a breach of copyright, as it covers more than simple copying-and-pasting.
- **Breach of copyright.** The unauthorized reuse of copyright material, that is the copying of significant amounts of text or tables or figures. This can include unauthorized reuse by an author of their own material that is now copyright of another publisher. SGM makes use of the [CrossCheck](#) service to detect text duplication.
- **Fabricated data.** This can include figures that have been digitally manipulated, for example to mask gel bands or alter contrast to make certain features more or less visible or to give the impression that data from separate experiments were in fact obtained in the same experiment.
- **Problems with authorship.** Authorship problems include complaints that individuals have been inappropriately excluded from authorship or included without their knowledge, as well as accusations of guest, ghost or gift authorship.
- **Undisclosed conflict of interest.**
- **Appropriation of ideas or data by a reviewer.**

SGM promotes the [COPE International Standards](#) for responsible research publication for authors and Editors.

Further guidance on research integrity can be obtained from the [US Office of Research Integrity](#).

Conflict of interest. A conflict of interest may exist when your interpretation of the results or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Examples of potential financial conflicts of interest include receipt of

funding or salary from an organization that might gain or lose financially from publication of your paper, if you hold stocks or shares in such an organization or if you hold or are applying for a patent relating to the content of this manuscript. Examples of non-financial conflicts of interest might include political, religious or intellectual conflicts.

Reagent sharing. Authors of papers published in *Microbiology* are expected to make biological materials, such as strains, plasmids and antibodies, that are described for the first time in the paper available to bona fide researchers in reasonable quantities and at reasonable cost, for non-commercial purposes. Supply of such materials must conform to current local and national laws and regulations.

Materials and results obtained from outside the authors' laboratory. If a paper includes results that were not obtained by the authors' own experiments (e.g. production of antibodies, identification of strains) this must be explicitly stated, and appropriate acknowledgement be included where appropriate.

1.3.5 Policy on security and censorship

The policy of SGM Council on scientific publication, security and censorship can be found [here](#).

1.3.6 Author self-archiving

Details of the SGM policy on author self-archiving can be found [here](#).

Authors may mount a PDF file of their accepted manuscript on their own or their institution's website or on a centrally organized repository, provided that the PDF is not publicly available until 12 months after online publication in the journal. The PDF file must correspond exactly to the accepted version of the manuscript. Authors may not mount a PDF of the final published version, although they should include a link to the published version. Author manuscripts must not be mounted less than 12 months after publication in the online version of *Microbiology*, nor must they be mounted on a server for the purpose of commercial sale or systematic external distribution by a third party (e.g. via an e-print server).

1.3.7 Open access and PubMed Central deposition

SGM is a signatory of the National Institutes of Health (NIH) Portfolio Agreement; as a result, papers that acknowledge funding from NIH will be deposited by SGM in PubMed Central and will be freely available from PubMed Central 12 months after publication. Because SGM has signed the

Portfolio Agreement, authors are no longer able to deposit their own manuscripts in PubMed Central. Details of the SGM policy on deposit in other repositories can be found [here](#).

Authors who pay for immediate open access through our [Open Option scheme](#) will have their papers deposited in PubMed Central (and mirror sites such as UKPMC) by SGM at the time of publication with no delay to public access, in addition to their paper being freely available to all without a subscription immediately on online publication.

2. Preparing and Submitting a Paper

2.1 General information

All papers must be submitted online, via the Bench>Press system. Submissions are not accepted in hard copy or by email. Authors should read these guidelines before going to the Bench>Press site to submit a paper. Further details and help pages are available on the Bench>Press site.

2.2 Pre-submission checklist

Authors must:

1. read the Information for Authors and ensure that their paper complies with this before submission;
2. all agree to the submission and agree that the corresponding author may act on their behalf throughout the review and publication process;
3. provide the names and contact details of at least three (and not more than five) potential reviewers;
4. obtain permission for any citations of personal communications or unpublished results; this should be confirmed in a covering message;
5. indicate the Contents Category for the paper on the title page (it should also be entered in the Contents Category field of the online submission form in [Bench>Press](#));
6. include on the title page the word count of both the summary and the main text (including the figure and table legends, in-text citations and any appendices, but not including the title page, acknowledgements, table bodies and footnotes, or reference list) and the number of tables and figures;

7. use continuous line numbering throughout the manuscript, to facilitate online reviewing;
8. ensure that citations of references in the text and references list conform to journal style;
9. upload any supplementary material associated with the paper as a supplementary file(s) for peer review with the paper;
10. upload cited papers that have been accepted for publication but are not yet published as a supplementary file(s);
11. include an accession number from one of the public databases (GenBank, EMBL, DDBJ or PIR) if the paper reports new sequence data; the relevant deposition criteria for the database must be adhered to.

2.3 Preparing files for submission

Papers can be submitted initially either as a single PDF file or as separate word-processor and image files, which will be compiled into a PDF by the system. The submission system will also attempt to prepare an HTML version of the reference list with links to papers that it can identify on the PubMed and HighWire databases, for use by the reviewers. This conversion will not work reliably if the reference format is incorrect (see the section on [References](#) for the correct style); however, an HTML reference list is not essential for review of the paper to proceed. Supplementary material should be submitted as a separate file(s), rather than being incorporated within the single PDF or word-processor file. When submitting the revised version of a paper, authors should supply the source files for the text and figures, to expedite the publication of the paper if it is accepted.

Submission as a single PDF. Please refer to the [Help pages](#) on the submission site for guidelines on preparing PDFs for submission, including advice on reducing the size of image files (the submitted PDF should preferably not be much larger than 1 MB).

Submission as separate word-processor and image files. Most standard word-processor files (including .docx files produced in Word 2007 or 2010) will convert successfully to PDF. Times, Times New Roman, Courier, Helvetica and Arial, and the Symbol font for special characters, are the recommended fonts. Other fonts are not guaranteed to convert successfully to PDF. Tables for the main paper must be prepared as part of the word-processor file; they must not be supplied as images or Excel files. (Excel files are, however, acceptable for supplementary data). Word-processor files

including inserted image files will normally be converted successfully to PDF by the system, but please note that files using OLE (Object Linking and Embedding) technology to display information or embedded files are not supported. If the conversion is not satisfactory, either convert the file to PDF yourself, and submit that, or submit the image files separately.

The file types that are supported for submission as separate image files for conversion to PDF are PDF, GIF, TIFF, EPS, JPEG and PPT. A resolution of 300 d.p.i. at a reasonable size of reproduction is recommended; in other words, an image intended to fit in a single column of the journal should be around 1000 pixels wide and an image intended to fit across two columns should be around 2000 pixels wide. The following file types are not supported at the initial submission stage as they cannot be converted to PDF by the system: bitmap (.bmp), PICT (.pict), Excel (.xls), Photoshop (.psd), Canvas (.cnv), CorelDRAW (.cdr) and locked or encrypted PDFs. Image files will be converted to PDF and added to the end of the manuscript PDF produced by the system. If any of the image files are very large, it is advisable to reduce their size before submission if possible: refer to the [Help with Online Submission pages](#) for guidelines on how to do this.

Our requirements for files intended for publication are different from those for files that will be converted to PDF by the Bench>Press system as part of an initial submission, as set out in the [Files for Publication](#) section of these instructions. If you are unsure whether your file formats are suitable, please contact the Editorial Office.

2.4 General style and layout

The paper must be written in clear and concise English, normally in the past tense, and should normally comprise: (a) [Title page](#); (b) [Summary](#); (c) [Introduction](#); (d) [Methods](#); (e) [Results](#); (f) [Discussion](#), with Conclusions if appropriate; (g) [Acknowledgements](#); (h) [References](#); (i) [Tables](#); (j) [Figures](#), with legends. A Theory section and Appendices may be included. Where appropriate, the Results and Discussion may be combined. Figures and tables should only be used to illustrate points that cannot easily be described in the text. [Please check the length guidelines before submitting your manuscript and check that your paper is an appropriate length.](#) Authors should consult a recent issue of the journal for the layout of headings, tables, etc. Guidance on the presentation of individual sections is given below.

2.4.1 Title page

This should carry the following information.

- The title of the paper. A good title is very important. It will attract readers and facilitate retrieval by online searches, thereby helping to maximize citations. The title should include topical keywords and allude to the interesting conclusions of the paper. A title that emphasizes the main conclusions, or poses a question, has more impact than one that just describes the nature of the study.
- A short 'running title', of not more than 55 characters (including spaces), for use as a headline.
- The [Contents Category](#).
- The names of the authors. The author for correspondence must be clearly indicated.
- The name and address of the laboratory or laboratories where the work was done, and present addresses of authors who have since moved.
- An e-mail address and telephone and fax numbers for the corresponding author.
- The number of words in (i) the summary and (ii) the main text (including the figure and table legends and any appendices, but not the title page, summary, acknowledgements, table bodies and footnotes, or references) and the number of tables and figures.
- A footnote 'The GenBank[/EMBL/DDBJ] accession number for the [16S rRNA gene/*gyrA*, etc.] sequence of XXXXX is XX00000', where a new sequence(s) has been determined.
- If appropriate, a footnote defining any non-standard abbreviations. Guidance on abbreviations not requiring definition is given in the [Abbreviations](#) section.

2.4.2 Summary (Abstract)

The summary will be read by more people than the full paper. It must therefore be clear and comprehensible in its own right. References should not be cited, and any abbreviations used must be defined. The summary should if possible introduce the subject in the first sentence and present the main conclusion in the last sentence: when someone is skimming a block of text, the first and last sentences receive the most attention. The recommended maximum length for the summary is 250 words.

2.4.3 Introduction

This should state the objectives of the work, but should not contain a detailed summary of the results. Authors should not assume that all readers will know why an area is worth studying; they should briefly make this clear. Previous relevant work should be sufficiently cited but this should not constitute a full review.

2.4.4 Methods

Sufficient detail should be provided to allow the work to be repeated. The suppliers of chemicals and equipment should be indicated if this may affect the results. Suppliers' addresses should not be given unless this is considered essential for a particular reason. A source (name and brief address) or reference should be given for each strain used. Authors are encouraged to deposit important strains in a recognized culture collection and to refer to the collection and strain number in the paper.

2.4.5 Results

There should be sufficient subheadings to make clear how the work was organized, what the key questions being addressed were, how one experiment led to another, and perhaps what conclusions were reached. A reader should gain a clear picture of the work from the subheadings.

Reproducibility of results should be indicated. It should be stated how many times an experiment was repeated and whether means or representative results are shown. Variability should be indicated statistically wherever possible; when error terms are given, the measure of dispersion and the number of observations should be stated. Statistical techniques used must be specified, and where necessary they should be described fully or a reference given. If results are expressed as percentages, the absolute value corresponding to 100% should be stated.

2.4.6 Discussion

This should not recapitulate the results, and should not be too long. Excessive discussion of few facts often gives an impression of poor science. Subheadings should be used where appropriate, to highlight the points under discussion. It may be helpful to list the main conclusions at the end. A combined Results and Discussion section is encouraged where appropriate.

2.4.7 Acknowledgements

An Acknowledgements section is not compulsory but may be included. If required, please state the names of funding bodies and grant numbers in this section. Authors may also wish to acknowledge individuals who have contributed materials, expertise or time to the study who are not named as authors.

2.4.8 References

References in the text should be cited as follows: two authors, Smith & Jones (1996) or (Smith & Jones, 1996); three or more authors, Smith *et al.* (1996) or (Smith *et al.*, 1996). References to papers by the same author(s) in the same year should be distinguished in the text and the reference list by the letters a, b, etc. (e.g. 1996a or 1996a, b).

For references with ten or fewer authors, give the names of all authors in the form "Surname, Initials". For references with more than ten authors, list the first nine followed by "& other authors".

Sample journal references:

Cerdà-Cuellar, M., Rosselló-Mora, R. A., Lalucat, J., Jofre, J. & Blanch, A. (1997). *Vibrio scophthalmi* sp. nov., a new species from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Int J Syst Bacteriol* **47**, 58–61.

Pasta, F. & Sicard, M. A. (1996). Exclusion of long heterologous insertions and deletions from the pairing synopsis in pneumococcal transformation. *Microbiology* **142**, 695–705.

Sample journal reference for more than ten authors:

Tomb, J.-F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H.-P., Gill, S. & other authors (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**, 539–547.

Sample reference to a whole book:

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sample reference to a book chapter or section:

Romano, A. H. & Saier, M. H., Jr (1992). Evolution of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. I. Physiological and organismic considerations. In *The Evolution of Metabolic Function*, pp. 171–204. Edited by R. P. Mortlock. Boca Raton, FL: CRC Press.

References to websites

It is not practical to provide a generic example of a reference to a website. Essential items that must be provided are:

- an author(s) (which may be a company name or organization);
- a year of 'publication' (which may be the year that the site was last updated);
- the URL (web address) of the page;
- a page title (which will hopefully allow the page to be found using a search engine if the URL subsequently changes)

For a website that is frequently updated, it may be useful to provide the date that the site was accessed, particularly if specific information is quoted that may have changed when the article is read.

Authors who use **EndNote** or **Reference Manager** can download the style for *Microbiology* by clicking on the links below:

[EndNote output style](#)

[Reference Manager output style](#)

Please note the following style points:

- References in the list must be given in alphabetical order, except for papers with three or more authors, which should be listed in chronological order after any other papers by the first author.
- References must include the title of the paper as well as both initial and final page numbers.
- Titles of journals should be abbreviated according to the system used by [MEDLINE](#); no stops should be used after abbreviated words.
- References to books should include year of publication, title (in full), edition, editor(s) (if any), town of publication and publisher, in that order. When the reference is to a particular part of a book, the inclusive page numbers of the chapter or section and, if appropriate, chapter title must be given.
- Only papers accepted for publication but not yet published may be cited as 'in press' in the reference list, and the reference must include the name of the journal. Relevant papers cited as 'in press' should be included as supplementary files with the online submission. References to papers not yet accepted should be cited in the text as unpublished results, giving the surname(s) and initials of all the author(s). Such papers should not appear in the list of references.

- Permission must be obtained for any personal communications or citations of other workers' unpublished results.

2.4.9 Tables

These should be broadly comprehensible without reference to the text, but it is not necessary to repeat detailed descriptions of methods, etc. The symbols * † ‡ § || ¶ # should be used for footnotes, rather than superscript letters or numbers. When results are expressed as percentages, the absolute value(s) corresponding to 100% must be stated. Statements of reproducibility should be included (see above). Tables should not be used to present results that can be described by a brief statement in the text.

2.4.10 Figures

This section outlines journal policy on figures. See these links for advice on preparing figures for inclusion as a PDF for [submission](#) and on the [source files](#) needed for publication.

Figures should not be used to present results that can be described by a brief statement in the text. The points outlined above for tables regarding comprehensibility, relative values and reproducibility also apply to figures and their legends. The inclusion of large amounts of tabular data in figures is discouraged and authors may be asked to move such data to the text or a separate table. Authors should be aware that after publication, tabulated data within figures are not accessible via online text searching.

Figures must be referred to in the text as Fig. 1(a) **not** Fig. 1A or Figure 1(A) or as (Fig. 1a) **not** (Figure 1A). Multipart figures should be labelled (a), (b), etc., **not** (A), (B), etc.

Line drawings. These should be of a quality suitable for direct reproduction. The maximum printed size, including lettering and legends, is 176 x 235 mm. Line thicknesses and symbol sizes should be sufficient to allow for reduction. The preferred symbols for graphs are filled and open circles, squares, triangles or diamonds. Where possible, the same symbol should be used for the same quantity in different figures.

Bar diagrams. Simple bar diagrams reporting only a few values are usually unnecessary; the data can normally be given in a few lines of text. It is editorial policy not to publish bar diagrams with 'three-dimensional' bars unless there is a specific justification for their use.

Sequence data. Figures showing full gene sequences are not published, but selected sequence data, with appropriate annotation, may be

published where there is justification. The layout of sequence figures should be designed to fit either the full width of the page (176 mm) or a single column (84 mm). For adequate legibility, the height of the characters should be not less than 1.5–2 mm (or 6–8 point). For printing at full page width with this size of type, a layout with 80–100 nucleotides per line is appropriate (or 60–70 if there are spaces between the codons). For a single-column layout, 50–60 nucleotides per line is about right. The spacing between the lines of sequence should be as close as is consistent with clarity. Note that sequence data must be submitted to GenBank, EMBL or DDBJ.

Microbiology does not publish figures whose principal function is to present primary sequence data, since the data can be accessed through the databases. To merit publication, sequence figures must be justified by the additional annotation they present; they should normally be limited to regions of particular interest. Limited sequence alignments of nucleic acids and proteins are acceptable provided they make a significant point. See above for guidance on presentation of sequence figures. Sequence data that are not suitable for print publication can, where appropriate, be published as online-only supplementary data.

Digital photographs (halftones). Authors are advised to supply halftones intended for publication as TIFF or EPS files. The resolution should be at least 300 d.p.i. at final size (approx. 1000 pixels wide for a single-column figure; approx. 2000 pixels wide for a double-column figure). For photomicrographs, the scale should be shown by a scale bar.

2.4.11 Colour figures

These are published at no cost to the author, if the Editors believe that colour is essential to show the results. Colour figures should preferably be supplied as TIFF or EPS files. The resolution should be at least 300 d.p.i. at final size (approx. 1000 pixels wide for a single-column figure; approx. 2000 pixels wide for a double-column figure). The files should preferably be generated as CMYK (4-colour) images, not RGB, as these reproduce better in print.

2.4.12 Supplementary material

Material associated with a paper but not suitable for print publication (e.g. large datasets, sequence alignments, 3D structures, movie files) can be included as online-only supplementary data. Data that are essential for interpretation of the results of the main paper should be included in the main paper. All supplementary data files will be reviewed along with the main paper; these will not be published unless they significantly enhance the

paper. The Editors may sometimes suggest that figures or tables that the author has included within a paper should be converted into supplementary data.

Supplementary data files must not include methods for results that are included in the main paper, nor should they introduce different results or new discussion points. Supplementary figures and tables should be named Fig. S1, Table S1, etc., and be cited accordingly in the main paper. A heading and, if appropriate, a short legend or text description must be supplied for each supplementary data item.

File types and formatting for supplementary data. The contents of the supplementary file should be indicated in the 'File label' field when the file is uploaded. Most file types can be supported but authors should try to avoid files that require unusual software, because these will be of limited use to readers. Very large files should also be avoided where possible because they may be difficult to download. Editorial staff may apply stylistic editing to supplementary files, and will, where possible, convert the files to PDF format for online publication.

3. Style, Nomenclature and Units

3.1 Nomenclature of micro-organisms

The correct name of the organism, conforming with international rules of nomenclature, must be used; if desired, synonyms may be added in parentheses when the name is first mentioned. Names of bacteria must conform with the current Bacteriological Code and the opinions issued by the International Committee on Systematics of Prokaryotes. See the [International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology Instructions for Authors](#) for more details. Names of algae and fungi must conform with the current International Code of Botanical Nomenclature. Names of protozoa must conform with the current International Code of Zoological Nomenclature.

The following may be useful:

- [List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature](#)
- [Bergey's Manual of Systematic Bacteriology](#)

3.1.1 Vernacular names

Generic names are singular Latin nouns and do not take a plural verb. Authors should avoid the use of a generic name alone when the reference is to the members of the genus. Thus, 'The strains (species or cultures) of *Salmonella* are...' not 'The *Salmonella*

are...'. The latter implies more than one generic name *Salmonella*.

Many micro-organisms are known by their vernacular (common) names as well as by their scientific names. The vernacular name for an organism may vary from language to language or from place to place, even within the same country. There are no rules governing the use of vernacular names.

It is often convenient to use vernacular names coined from the generic names. In these forms, the initial capital letters are dropped and italics are not used. For plural forms of vernacular names, Latin or other plural endings are used, depending primarily on euphony. Thus, the vernacular singular for a member of the genus *Spirillum* is spirillum, and the plural generally used in the English language is spirilla (Latin plural), not spirillums (English plural). Occasionally, more than one common name arises from a generic name, such as treponema (plural treponemata or treponemas) and treponeme (plural treponemes) from *Treponema*.

3.2 Chemical and biochemical nomenclature

Authors should follow the recommendations of IUPAC for chemical nomenclature, and those of the Nomenclature Committee of IUBMB and the IUPAC–IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature for biochemical nomenclature (see <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/jcfn>).

3.3 Enzyme nomenclature

The system published in Enzyme Nomenclature (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>) should be followed. Enzyme Commission numbers should be given where appropriate.

For restriction enzymes, use e.g. *EcoRI* **not** EcoRI, etc.; *HindIII* **not** HindIII, HindIII, *Hind III*, etc.

3.4 Genetic nomenclature

For bacterial gene names, use e.g. *gyrA* **not** *gyrA*; *arg-1* **not** *arg1* or *arg1*, etc.

The following proposals should be adhered to wherever possible.

Bacteria: Demerec, M. *et al.* (1966) *Genetics* **54**, 61–76 [also *J Gen Microbiol* (1968), **50**, 1–14].

Plasmids: Novick, R. P. *et al.* (1976) *Bacteriol Rev* **40**, 168–189.

Saccharomyces cerevisiae: Sherman, F. (1981) In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*. I. Life Cycle and Inheritance, pp. 639–640 (edited by J. N. Strathern *et al.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory).

Aspergillus nidulans: Clutterbuck, A. J. (1973) *Genet Res* **21**, 291–296.

Neurospora crassa: *Neurospora Newsl* (1978), **25**, 29.

3.5 Abbreviations

Abbreviations must be listed on title page, and defined at first mention in both Summary and main text.

The following need **not** be defined:

1D, 2D, 3D; aa; ACES; ADA; ADP, cAMP, ATP, etc.; AIDS; BES; Bicine; bp; BSA; CAPS; CCD; CDS; c.f.u.; CHAPS; CHES; CIE; CLSM; CM-cellulose; CoA; c.p.m.; Da; DAPI; DEAE-cellulose; DIG; DMSO; DNA, cDNA, CCC DNA, dsDNA, ssDNA, DNase; DNP; d.p.m., d.p.s.; DTT; ED₅₀; EC₅₀; EDTA, EGTA; ELISA; EMS; e.o.p.; EPR or ESR; FACS; FAD; FBS; FCS; FISH; FITC; FMN; FPLC; GC or GLC; GSH, GSSG; HEPES; HEPPS; HPLC; IC₅₀; i.d.; IEF; IgG, IgM, etc.; IPTG; IR; kb, kbp; LD₅₀; LPS; LSU; mAb; MES; MIC; MLST; m.o.i.; MOPS; MS; NAD, NADP; NMR; nt; NTG; ONPG; ORF; PAGE; PBS; PCR; PEG; PFGE; p.f.u.; Pi, PPI; PIPES; PMSF; ppGpp, pppGpp; p.p.m.; p.s.i.; PVDF; Py-GC, Py-MS; RAPD; RBS; RFLP; RNA, mRNA, rRNA, tRNA, RNase; r.p.m.; RT-PCR; SDS, SDS-PAGE; SNP; SSU; TCA; TES; TLC; TNF- α , - β etc; Tricine; Tris; UPGMA; UV; X-Gal.

3.6 Units

3.6.1 General points

SI units should be used. If non-SI units are used, the equivalent in SI units should also be given, e.g. 1 p.s.i. (6.9 kPa).

For **compound units** (e.g. micrograms per millilitre), use $\mu\text{g ml}^{-1}$ not $\mu\text{g/ml}$; use 10 μg ampicillin ml^{-1} not 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin.

Give **concentrations** as g l^{-1} , etc., or molarity, M, **not** normality, N. The term '%' should be defined as 'w/v', 'v/v' or 'w/w' if this is necessary to avoid ambiguity.

For **radioactivity**, the preferred unit is becquerels (Bq); if given in curies (Ci), the equivalent in Bq **must** be given ($1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$); radioactivity may also be expressed as d.p.s. ($1 \text{ d.p.s.} = 1 \text{ Bq}$) or as c.p.m.

3.6.2 Molecular mass

M_r (relative molecular mass) should be used rather than 'molecular weight'. 'Molecular mass' should be used if values are quoted in daltons (Da) (e.g. molecular mass 20 kDa). Either M_r or molecular mass may be used, but they should not be mixed in any one paper. In table headings and figure axes, for values >1000 use kDa or $10^{-3} \times M_r$.

3.6.3 Absorbance, optical density and attenuation

The term absorbance, A , should be used for the quantity $\log(I_0/I)$ in UV and visible absorption spectrophotometry of samples in which there is negligible scattering or reflection of light. If scattering is considerable, as in spectrophotometric measurements of microbial biomass, the term optical density, OD (or attenuation, D), should be used; the path length of the cell or cuvette, and the make and model of the spectrophotometer, should be specified, because optical design dramatically influences such measurements. If a sample is diluted prior to measuring optical density, the dilution and the diluent should be stated. Readings obtained with instruments designed for turbid samples, such as nephelometers or Klett meters, should be reported in appropriate units. Whenever A , OD or D is used, the wavelength (in nm) of the incident light must be specified (e.g. A_{280} , OD₆₀₀).

3.7 Presentation of nucleotide and amino acid sequences

In the absence of a detailed discussion of specific structural features, the nucleotide sequence or proposed secondary structure should not be presented. Papers presenting sequence data should be accompanied by substantial additional experimentation to characterize the gene(s) and products(s) concerned, and by substantial computer analysis. *Microbiology* will not normally publish DNA sequences from double-stranded genomes unless the two strands have been sequenced independently.

Microbiology will not publish figures whose principal function is to present primary sequence data, since the data can be accessed through the databases. To merit publication, sequence figures must be justified by the additional annotation they present; they should normally be limited to regions of particular interest. Sequence alignments of nucleic acids and proteins may be presented using the supplementary data facility.

When making comparisons between nucleotide or amino acid sequences, it is important to use the correct terminology. 'Homology' has a precise biological meaning of 'having a common evolutionary origin'. When a percentage comparison is made, the terms 'identity' or 'similarity', as appropriate, must be used.

Submitted manuscripts containing new sequence data should include, on the title page, the footnote 'The GenBank[EMBL/DDBJ] accession number for the XXXXX sequence of XXXXX is XX00000'.

4. Peer Review and Publication

4.1 Editorial handling of papers

Submitted papers are checked by the editorial staff to ensure that they comply with the journal's requirements. If any problems are noticed, the paper will be returned to the author for amendment before being assigned to an Editor or Associate Editor (AE). After the above step, papers are assigned by the editorial staff to an Editor or AE with appropriate expertise, who is responsible for making the decision on acceptability; while every effort will be made to select an Editor or AE suggested during the submission process, the editorial office staff reserve the right to assign the paper to another Editor or AE if the one suggested is unavailable or another Editor or AE is considered significantly more appropriate. Before sending a paper to reviewers, the AE or Editor will pre-screen the paper to check that it fulfils certain basic criteria that would make it potentially suitable for *Microbiology*: nature of the study, quantity and quality of data, general conclusions, and standard of presentation. If the paper does not fulfil these criteria, it may be rejected at this stage, so that the authors can submit it to a more appropriate journal without further delay. Papers that pass the pre-screening stage will normally be sent to at least one independent reviewer, but the AE or Editor may also act as a reviewer him/herself. Authors must suggest at least three, and up to five, potential reviewers and are also able to request that up to five individuals are excluded. Every effort will be made to accommodate author requests, but we cannot guarantee to follow these requests in every instance.

4.2 Submitting a revised manuscript

If revision of a paper is requested, the revised version should be returned within the time specified. If more time is required, the author should contact the Editorial Office (micro@sgm.ac.uk), AE or Editor to discuss a new

deadline. If revision is delayed by the author without prior agreement, the revised version will be treated as a new submission. When submitting the revised version of a paper, authors should supply the [source files](#) for the text and figures, to expedite the publication of the paper if it is accepted.

4.3 Source files for publication

Our requirements for files intended for publication are different from those for files that will be converted to PDF by the submission system as part of an initial submission. If you are unsure whether your file formats are suitable, please contact the Editorial Office.

4.3.1 Text

The text (including tables, but without embedded figures) must be supplied as a word-processor file. Word files are preferred; .docx files produced in Word 2007 or 2010 can be used as source files. TeX and LaTeX formats can not be used.

4.3.2 Tables

Tables must **not** be supplied as image files (TIFF, PDF, PowerPoint); files containing tables prepared as images (whether provided separately or pasted into a Word file) will be returned to the author and this may delay publication. Tables should be prepared using your word-processor's table functions, with individual entries in individual table cells. They must **not** be supplied as tab- or space-separated text or as multiple entries separated by line breaks in single table cells. Tables prepared in Excel can be accepted but are not desirable.

4.3.3 Equations

Equations that cannot be represented using the keyboard can be prepared using the Word equation editor (in versions up to Word 2003) or MathType. Word 2007/2010 users should **not** use the default equation editor to prepare equations as it is not compatible with any other current software; equations in Word 2007/2010 should be prepared using the MathType equation editor or the 'legacy' equation editor included as part of Word (i.e. a Microsoft Equation 3.0 object, accessible from 'Insert Object' on the 'Insert' ribbon).

4.3.4 Line figures

Line figures should be produced as vector rather than bitmap (raster) images. Acceptable formats are PDF, EPS, CorelDRAW (.cdr; version 15 or earlier),

Adobe Illustrator (.ai), Excel (.xls), Word and PowerPoint. Fonts must be embedded for figures supplied as PDF or EPS. TIFF and other bitmap formats are not recommended for line figures; if their use cannot be avoided, the resolution should be at least 600 d.p.i.

Charts prepared in Microsoft Excel should be supplied in Excel format where possible. If they are copied and pasted into another Microsoft application, use Paste Special and select 'Picture (Enhanced Metafile)'.

4.3.5 Halftone figures (photographs)

The preferred format for halftones (i.e. photographic images) is TIFF, but PDF, EPS and JPG/JPEG are also acceptable. If image files are pasted into Word, PowerPoint, Photoshop, etc., in order to add lettering or other annotation or **to combine line and halftone images**, the original unlabelled halftone images should also be supplied.

A final print resolution of 300 d.p.i. or more is recommended; i.e. an image intended to fit in a single column of the journal should be around 1000 pixels wide and an image intended to fit across two columns should be around 2000 pixels wide. Colour images should use CMYK colour (which can be reproduced in print) rather than RGB (which cannot be reproduced faithfully using four-colour printing) (this setting can be accessed in Adobe Photoshop via Image:Mode:CMYK Color, for example). For some colour images, such as fluorescence micrographs, it may be useful to submit an RGB version of the image to be mounted online as supplementary material.

4.3.6 Scanning images

If images must be scanned, a resolution of 300 d.p.i. is usually sufficient for same-size reproduction of halftone (photographic) images without text, whereas 600 or 1200 d.p.i. should be used for figures containing lines and/or text. The scanned image should be cropped to remove as much white space as possible and supplied in TIFF format.

4.3.7 Supplementary material

Files supplied as supplementary material should follow the appropriate guidelines given above. If supplementary files contain material that cannot be represented in print (sound, video, computer programs, etc.), please consult the Editorial Office for advice on suitable formats.

4.4 Publication ahead of print

Microbiology has a [Papers in Press](#) feature where accepted manuscripts appear online in an unedited format before they are scheduled to appear in print. Unless the authors inform the Editorial Office staff (micro@sgm.ac.uk) to the contrary, it will be assumed that they agree to their manuscript being used in this way. Please note that the PDF used for peer review, and the manuscript title, subject category and author details that authors have entered into the online submission site, will be used to generate the Papers in Press record.

4.5 Proof corrections

Proofs are sent by email as a PDF attachment to the email address supplied for the corresponding author. It is the authors' responsibility to inform the Editorial Office of any changes to this email address.

Only typographical and absolutely essential factual changes may be made. Authors may be charged for the correction of non-typographical errors.

4.6 Reprints

As a result of declining reprint orders and feedback from many authors who tell us they have no use for reprints, SGM no longer provides free reprints to corresponding authors; instead, corresponding authors will receive an email including a link to download the published PDF of their paper. The link can be forwarded and used to download the published PDF up to 25 times.

Reprints of published papers can be purchased from the [SGM Reprint Service](#).

4.7 Cover illustrations

The Editors welcome the submission of pictures for possible use on the front cover, and will pay £75 towards expenses for each one used. Pictures need not be linked with a paper in the journal.

ANEXO C - Comprovante de submissão à Revista Microbiol Drug Resistance

ScholarOne Manuscripts

06/02/14 19:45

Microbial Drug Resistance
Mechanisms, Epidemiology, and Disease

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

SCHOLARONE™
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Dyana Veras

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Microbial Drug Resistance*.

Manuscript ID: MDR-2014-0026

Title: Inhibition of production of polysaccharide capsule by cephalosporins, aztreonam and imipenem in *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying the genes blaSHV, blaTEM, blaCTX-M or blaKPC

Authors: Veras, Dyana
Lopes, Ana
Feltosa, Ana Paula
Goncalves, Gabriel
Chaves, Marlos
Freitas, Catarina
Lima, Fernanda Cristina
Padilha, Rafael Jose
Alves, Luiz
Brayner, Fabio Andre

Date Submitted: 06-Feb-2014

 [Print](#)  [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.14.1 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2014. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 [Follow ScholarOne on Twitter](#)

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

ANEXO D – Normas da Revista Microbial Drug Resistance

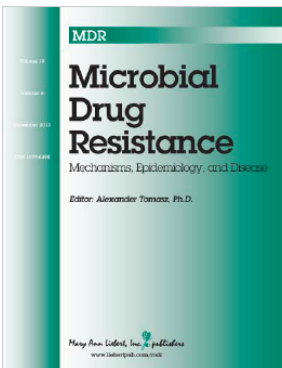
Microbial Drug Resistance

06/02/14 19:38





[Home](#) [Publications](#) [Resources](#) [Librarians](#) [Press](#) [Advertise](#)



[Read Online](#) [Subscribe/Renew](#) [For Authors](#)

Microbial Drug Resistance

Editor: Alexander Tomasz, PhD
ISSN: 1076-6294 • **Published Bimonthly** • **Online ISSN:** 1931-8448
Current Volume: 19
Latest Impact Factor* is 2.364
*2012 Journal Citation Reports® published by Thomson Reuters, 2013



LOGIN
YOUR EMAIL:
Sign up to stay informed—receive email notifications for this journal

[OPEN Access : Options & Benefits](#)

About This Publication:

- [Overview](#)
- [Editorial Board](#)
- [Manuscript Submission](#)
- [Read Online/TOC](#)
- [Press Releases](#)
- [Testimonials](#)
- [Subscribe/Renew](#)
- [Recommend this title to your Library or Institution](#)
- [Reprints, Rights, & Permissions](#)
- [Advertising](#)
- [Fast Facts](#)
- [Multi-site Licenses](#)
- [Disclaimer](#)

Sample Content [►](#)



2.348 pessoas curtiram isso.
[Cadastre-se](#) para ver do que seus amigos gostam.

It is critical to ensure the accuracy of ALL authors' email addresses when uploading submissions to Manuscript Central to ensure the proper delivery of all email communications.

Please read all the instructions to authors before submitting.

Manuscripts should be submitted with the understanding that they have neither been published, nor are under consideration for publication elsewhere, except in the form of an abstract. Prior abstract publications should be described in the form of a footnote to the title. Published manuscripts become the sole property of the Journal and will be copyrighted by Mary Ann Liebert, Inc. By submitting a manuscript to the Journal, the author(s) agree(s) to each of the above conditions. In addition, the author(s) explicitly assign(s) any copyrighted ownership he/she (they) may have in such manuscript to the Journal. Upon acceptance of any manuscript, all authors will receive a follow-up email with instructions on how to complete our online Copyright Agreement form.

FAILURE BY ALL AUTHORS TO SUBMIT THIS FORM MAY RESULT IN A DELAY OF PUBLICATION.

The corresponding author is responsible for communicating with coauthors to make sure they have completed the online copyright form. Authors not permitted to release copyright must still return the form acknowledging the statement of the reason for not releasing the copyright.

Click here to submit your paper via our fast and user-friendly electronic submission system.

PREPARATION OF MANUSCRIPT

Submit text manuscript in Microsoft Word double spaced.

On the first page, give the title of the article, name(s) of author(s), institutional affiliation(s), and the name and complete address, phone and fax numbers of the corresponding author. Following this, please include the introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgments, references, tables, and figure legends.

Results and Discussion should be separate sections. Number pages consecutively; the first author's last name should appear on each page. Authors should review the style and clarity of their manuscripts with colleagues before submission. Please follow this protocol to avoid delay in publication. Authors should note that manuscripts may be edited if needed for grammar and usage. Be prepared to enter a running title of no more than 45 characters, as well as an abstract of about 200 words, stating the aims, results, and conclusions drawn from the study.

TABLES AND ILLUSTRATIONS

Number each table consecutively and give each table a title. Each table must be in its own file. Each table must stand alone, i.e., contain all necessary information in the caption, and the table itself must be understood independently of the text. Details of experimental conditions should be included in the table footnotes. Information that appears in the text should not be repeated in tables, and tables should not contain data that can be given in the text in one or two sentences.

A legend should be supplied for each figure, and all legends numbered consecutively and provided (double spaced) in a separate file or as part of the text file. Figures should be numbered in the order cited in the text. Images should not show the name of a manufacturer or reveal patients' name(s). Please keep in mind that the figures will be reduced, so please do not submit large figures/graphs that contain small type, as the text within the figure will not be readable after reduction. Please follow these guidelines for submitting figures:

- Do NOT embed art files into a Word or PDF document.
- Line illustrations should be submitted at 1200 dpi.
- Halftones and color should be submitted at a minimum of 300 dpi.
- Save as either TIFF or EPS files.
- Color art must be saved as CMYK - **not** RGB Black and White art must be submitted as grayscale - Do **NOT** submit

PowerPoint, PDF, Bitmap or Excel files.

Please name your artwork files with the submitting authors name i.e. SmithFig1.tif, SmithTable2.tif etc. Authors who do not follow these guidelines may have their submission returned to them without being reviewed. You will be given directions on how to correct any files which do not pass. < ADDITIONAL INFORMATION ABOUT Converting Word or Excel files: Perhaps the best and easiest way to convert Word or Excel files into a format which is suitable for print is to scan them using the below guidelines: All files should be scanned at 100% size.

- 300 dpi
- Final color mode: cmyk
- save file as: .tif or .eps

If you need directions on how to convert a Power Point slide to acceptable format go to <http://www.liebertpub.com/MEDIA/pdf/ppconvert.pdf>

The Journal will publish color photographs, but the cost must be borne by the author. For further details, contact the Publisher.

If no conflicts exist, the authors must state "No competing financial interests exist."

Disclosure Statement

Immediately following the Acknowledgments section, include a section entitled "Author Disclosure Statement." In this portion of the manuscript, authors must disclose any commercial associations that might create a conflict of interest in connection with submitted manuscripts. This statement should include appropriate information for EACH author, thereby representing that competing financial interests of all authors have been appropriately disclosed according to the policy of the Journal. It is important that all conflicts of interest, whether they are actual or potential, be disclosed. This information will remain confidential while the manuscript is being reviewed and will not influence the editorial decision. Please see the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at <http://www.icmje.org/index.html#conflicts> for further guidance.

REFERENCES

All references must be cited in the text using a superscript Arabic number. Arrange the reference list in alphabetical order by first author and then number consecutively. Abbreviate journal names according to *Serial Sources for the BIOSIS Data Base* (BioSciences Information Service, 1992). Use the following format:

Journal articles:

De Lencastre, H., M. Chung, and H. Westh. 2000. Archaic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular and microbiological properties of isolates from the 1960s in Denmark. *Microb. Drug Resist.* 6:1-10.

Book:

Doyle, M.P., L.R. Beuchat, and T.J. Montville. 2001. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.

Chapter in a book:

Tomasz, A. 1990. Auxiliary genes assisting in the expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. In R.P. Skurray and R.A. Novick (ed.), *Molecular biology of the staphylococci*. VCH Publishers, New York, pp. 565-583.

Abstract:

Scacheri, P., J. Crabtree, A. Kennedy, G. Swain, J. Ward, S. Marx, A. Spiegel, and F. Collins. 2006. V804 RET mutation in MEN2A: first report. *J. Int. Med.* 255:712 (abstract).

Proceedings:

Lavilla, S., J.J. González-López, M.N. Larrosa, R.M. Bartolomé, and G. Prat. 2008. Prevalence of the quinolone-modifying enzyme *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona. Abstract presented at the 18th Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona, April 19-22. Abstract no. P1523.

Website:

Health Protection Agency (HPA). 2005. Detection of *Campylobacter* species. National Standard Method F 21, Issue 2. Available at www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp. (Online.)

When dates from an unpublished source are given, supply the researcher's name. If work is in press, give journal in which it is to be published. PERMISSIONS The author must obtain permission to reproduce figures, tables, and text from previously published material. Written permission must be obtained from the original copyright holder (generally the publisher, not the author or editor) of the journal or book concerned.

An appropriate credit line should be included in the figure legend or table footnote, and full publication information should be included in the reference list. Written permission must be obtained from the author of any unpublished material cited from other laboratories. All permissions listings must be shown in the manuscript—they cannot be entered on proofs.

Manuscripts submitted to this Journal must not be under consideration elsewhere. Reprints may be ordered by following the special instructions that will accompany page proofs, and should be ordered at the time the corresponding author returns the corrected page proofs to the Publisher. Reprints ordered after an issue is printed will be charged at a substantially higher rate.

PUBLISHER

Microbial Drug Resistance is published six times a year by Mary Ann Liebert, Inc., 140 Huguenot Street, New Rochelle 10801-5215 Telephone: (914) 740-2100; fax: (914) 740-2101.; E-mail: info@liebertpub.com Internet: www.liebertpub.com

The views, opinions, findings, conclusions and recommendations set forth in any Journal article are solely those of the authors of those articles and do not necessarily reflect the views, policy or position of the Journal, its Publisher, its editorial staff or any affiliated Societies and should not be attributed to any of them.

Recommended Publications

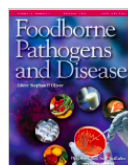
You may be interested in the following publications:



Biosecurity and Biodefense: Strategy, Practice, and Science



Surgical Infections



Foodborne Pathogens and Disease

[Browse All Publications »](#)

Mary Ann Liebert, Inc. publishers

RESOURCES/TOOLS

Advertise
Download Publications List
For Librarians
Journal Collections
Licensing – Institutional
Licensing – Personal
Liebert Author Advocacy
Program
Liebert Connect Email
Preference Center
Liebert for Mobile (L4M)
Liebert Open Access
Benefits
NIH/HHMI Wellcome Trust
Policies
Recommend a Title
Screen Savers
Self-Archiving Policy

SUBSCRIPTIONS

Change of Address
Collections
Custom Collections
Customer Support
Licensing – Institutional
Licensing – Personal
Recommend a Title

NEWS & EVENTS

Company News
Events
Press

ONLINE ACCESS

Additional Tools
Full Text Papers
Getting Started
Institutional Admin
Searching
User Accounts

COMPANY

About Us
Conferences
Contact
Directions
Institute for Professional
Education
Privacy Policy

Copyright©2012 Mary Ann Liebert, Inc. publishers. All rights reserved, USA and worldwide.

